



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

FIZIČKI ODSJEK

Marina Grabar Branilović

**EKSPERIMENTALNO UTEMELJENO
MODELIRANJE INTERAKCIJA
NUKLEINSKIH KISELINA
I MALIH MOLEKULA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
PHYSICS DEPARTMENT

Marina Grabar Branilović

**NUCLEIC ACID – SMALL MOLECULE
INTERACTIONS, EXPERIMENTALLY
BASED MOLECULAR MODELING
APPROACH**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

FIZIČKI ODSJEK

Marina Grabar Branilović

**EKSPERIMENTALNO UTEMELJENO
MODELIRANJE INTERAKCIJA
NUKLEINSKIH KISELINA
I MALIH MOLEKULA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Sanja Tomić

Zagreb, 2014.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
PHYSICS DEPARTMENT

Marina Grabar Branilović

**NUCLEIC ACID – SMALL MOLECULE
INTERACTIONS, EXPERIMENTALLY
BASED MOLECULAR MODELING
APPROACH**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Prof. dr. sc. Sanja Tomić

Zagreb, 2014.

Ova disertacija izrađena je u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Sanje Tomić u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija fizike pri Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Većina računa izvedena je na računalnom serveru Isabella i Hrvatskoj nacionalnoj mreži računala (CRO-NGI) u sklopu Sveučilišnog računskog centra (SRCE) Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Veliko i najiskrenije hvala iznimnoj mentorici prof. dr. sc. Sanji Tomić na velikom angažmanu, sugestijama i pomoći pri izradi doktorske disertacije, na stručnom vodstvu proteklih godina, pruženoj edukaciji te nadasve prijateljskom odnosu.

Najljepša hvala dr. sc. Lidiji-Mariji Tumir i dr. sc. Ivi Piantanidi iz Laboratorija za studij interakcija biomakromolekula Zavoda za organsku kemiju i biokemiju IRB-a na divnoj suradnji, pristupačnosti, podučavanju i svim udijeljenim eksperimentalnim rezultatima.

Hvala svim članovima Laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju Zavoda za fizičku kemiju IRB-a na pruženoj ugodnoj radnoj atmosferi. Posebno hvala grupi za modeliranje.

Hvala kolegi dr. sc. Hrvoju Brkiću na pomoći pri izvedbi QM računa i svim ostalim sugestijama.

Najiskrenije hvala dragim kolegama i prijateljima, doc. dr. sc. Branimiru Bertoši i Igoru Sabljicu, dipl. ing. na bezrezervnoj spremnosti na pomoć, savjetima te bezbrojnim lijepim trenucima.

Veliko hvala mojim dragim roditeljima, baki i bratu na pruženoj neprocjenjivoj pomoći, svakodnevnoj brizi i podršci. Posebno hvala mami.

Iskreno hvala mom divnom suprugu na vječitoj podršci, razumijevanju, poticaju i svakom obliku nesebično pružene pomoći.

Najveće hvala našem sinčiću Mateju što postoji i svemu daje poseban smisao...

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Fizički odsjek

Doktorska disertacija

**EKSPERIMENTALNO UTEMELJENO MODELIRANJE INTERAKCIJA
NUKLEINSKIH KISELINA I MALIH MOLEKULA**

MARINA GRABAR BRANILOVIĆ

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

U okviru ove doktorske disertacije metodama molekulskog modeliranja proučavane su interakcije nukleinskih kiselina s nekoliko skupina organskih spojeva: derivatima bisfenantridina, guanidiniokarbonil-pirol-arilnim konjugatima, cijaninskim spojevima, te translacijskim (benzimidazolnim i diaminopiperidinskim) inhibitorima hepatitis C virusa. Istraženi su procesi njihovog kompleksiranja, interkaliranja, vezanja u utor te elektrostatskog međudjelovanja s polinukleotidima. Prve tri skupine spojeva imaju svojstvo molekulskog prepoznavanja nukleobaza, pa mogu poslužiti za razvoj novih specifičnih obilježivača pri istraživanju nukleinskih kiselina, te kao predložak za razvoj antitumorskih i antivirusnih lijekova sa svojstvom selektivnog blokiranja određenih sljedova DNA ili RNA.

Kao polazišne točke za modeliranje korišteni su rezultati spektroskopskih mjerenja (UV-Vis i CD spektri, fluorimetrijske titracije) te difrakcijske i NMR analize. Istraživanja su provedena metodama molekulskog modeliranja različitih stupnjeva složenosti. U svrhu određivanja novih parametara korišteni su kvantno mehanički računi. Proučavanje strukture i fleksibilnosti nukleinskih kiselina i njihovih kompleksa s organskim molekulama provedeno je metodama polja sila (molekulska mehanika i molekulska dinamika). Kombinirane kvantno mehaničke – molekulske mehaničke metode primijenjene su u svrhu ispitivanja utjecaja okoline, preciznije polinukleotidnog lanca i metalnih iona, na raspodjelu naboja na ligandima. Dobiveni rezultati u skladu su s eksperimentalnim saznanjima.

(108 stranica, 75 slika, 19 tablica, 108 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Ključne riječi: nukleinske kiseline, polje sila, molekulska mehanika, molekulska dinamika, kvantno mehanički računi, interkalatori, mali utor – vežući spojevi, inhibitori HCV-a

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici za fiziku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, Bijenička cesta 32.

Mentor: Prof. dr. sc. Sanja Tomić, znanstvena savjetnica, Institut Ruđer Bošković

Ocjenitelji: Dr. sc. Ivo Piantanida, znanstveni savjetnik, Institut Ruđer Bošković

Prof. dr. sc. Sanja Tomić, znanstvena savjetnica, Institut Ruđer Bošković

Doc. dr. sc. Matko Glunčić, Prirodoslovno-matematički fakultet

Rad prihvaćen: 30. svibnja 2014.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Physics

Doctoral Thesis

**NUCLEIC ACID – SMALL MOLECULE INTERACTIONS, EXPERIMENTALLY
BASED MOLECULAR MODELING APPROACH**

MARINA GRABAR BRANILOVIĆ

Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

Scope of this thesis is the computational, molecular modeling study of interactions between nucleic acids and organic compounds like bis-phenanthridinium derivatives, guanidiniocarbonyl-pyrrole-aryl conjugates, phosphonium dyes and translation (benzimidazole and diaminopiperidine) inhibitors of hepatitis C virus. They bind to polynucleotide in specific way, either as intercalators or groove binders and in addition establish strong electrostatic interactions with polynucleotides. The first three groups of compounds have ability of molecular recognition of nucleobases so they can be used either as a template for development of the new, highly specific nucleic acids markers or antiviral drugs with the ability to selectively block transcription of specific DNA/RNA sequences.

Starting points for modeling were results of spectroscopic measurements (UV-Vis and CD spectra, fluorimetric titrations) and X-ray and NMR analysis. Study was performed using molecular modeling methods of various degrees of complexity. In order to determinate new parameters quantum mechanics calculations were used. The study of the structure and flexibility of nucleic acids and their complexes with small organic molecules was performed using the force field methods (molecular mechanics and molecular dynamics), while influence of the nucleic acid environment, precisely polynucleotide strand and metal ions, on the ligand charge distribution was investigated by the combined quantum mechanics – molecular mechanics approach. The results obtained within the research are in accordance with the experimental findings.

(108 pages, 75 figures, 19 tables, 108 references, original in Croatian)

Keywords: nucleic acids, force field, molecular mechanics, molecular dynamics quantum mechanical calculations, intercalators, minor groove binders, HCV inhibitors

Thesis is deposited in the Central Physical Library, Faculty of Science in Zagreb, Bijenička cesta 32.

Supervisor: Dr. sc. Sanja Tomić, Professor, Scientific Advisor, Institute Ruđer Bošković

Reviewers: Dr. sc. Ivo Piantanida, Scientific Advisor, Ruđer Bošković Institute
Dr. sc. Sanja Tomić, Professor, Scientific Advisor, Ruđer Bošković Institute
Dr. sc. Matko Glunčić, Assistant Professor, Faculty of Science

Thesis accepted: May 30th, 2014

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. LITERATURNI PREGLED | 4 |
| 3. RAČUNALNE METODE | 13 |
| 3.1. Empirijske metode | 13 |
| 3.1.1. Polje sila | 13 |
| 3.1.2. Molekulska mehanika..... | 17 |
| 3.1.3. Molekulska dinamika | 19 |
| 3.1.4. Račun slobodnih energija | 27 |
| 3.2. Kvantno mehaničke metode | 30 |
| 3.2.1. Hartree-Fock <i>ab initio</i> metoda..... | 33 |
| 3.2.2. Metoda funkcionala gustoće..... | 34 |
| 3.2.3. Semiempirijske metode | 36 |
| 3.3. Kvantno mehaničke – molekulsko mehaničke metode | 37 |
| 3.4. Programi korišteni za analizu i vizualizaciju sustava | 39 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 40 |
| 4.1. Metode molekulskog modeliranja..... | 40 |
| 4.2. Interakcije konjugata bisfenantridin-nukleobaza s nukleotidima | 41 |
| 4.2.1. MD simulacije | 43 |
| 4.3. Interakcije bisfenantridinskih spojeva s polinukleotidima | 46 |
| 4.3.1. Molekulsko modeliranje..... | 48 |
| 4.3.1.1. Određivanje parametara za nukleobaze s protoniranim adeninima | 50 |
| 4.3.2. Rezultati MD simulacija konjugata 7-9 | 53 |
| 4.3.3. Rezultati MD simulacija ds-RNA i kompleksa ds-RNA- 7 , ds-RNA- 11 i ds-DNA- 9 | 54 |
| 4.4. Interakcije guanidiniokarbonil-pirol-arilnih konjugata s ds-DNA | 58 |
| 4.4.1. Metode molekulskog modeliranja | 59 |
| 4.4.2. Rezultati MD simulacija kompleksa ds-DNA- 2 | 60 |
| 4.4.3. Rezultati MD simulacija za komplekse ds-DNA- 3 i ds-DNA- 4 | 61 |
| 4.5. Interakcije cijaninskih spojeva s ds-DNA | 63 |
| 4.5.1. Metode molekulskog modeliranja | 64 |
| 4.5.2. Rezultati molekulskog modeliranja kompleksa cijaninskog spoja 2 s poli ds-DNA..... | 64 |

| | |
|---|------------|
| 4.6. Benzimidazolni inhibitori HCV-a | 69 |
| 4.6.1. Metode molekulskog modeliranja | 70 |
| 4.6.2. Rezultati MD simulacija IRES subdomene IIa bez vezanog liganda | 72 |
| 4.6.3. Rezultati MD simulacija kompleksa s IRES subdomenom IIa | 74 |
| 4.6.4. QM/MM pristup | 81 |
| 4.7. Diaminopiperidinski translacijski inhibitor (DAP) HCV-a | 85 |
| 4.7.1. MD simulacije kompleksa IIa-DAP | 86 |
| 5. ZAKLJUČAK | 88 |
| 6. DODATAK | 90 |
| 7. LITERATURA | 100 |
| 8. ŽIVOTOPIS | 106 |

Popis kratica

| | |
|---------|---|
| Å | Ångström (10^{-10} m), mjerna jedinica za duljinu |
| A | purinska dušična baza adenin |
| AMP | adenozin-5'-monofostat, dinatrijeva sol |
| atm | standardna atomsfera, jedinica za tlak, 1 atm = 101325 Pa |
| C | pirimidinska dušična baza citozin |
| CD | cirkularni dikroizam (engl. <i>Circular Dichroism</i>) |
| CMP | citidin-5'-monofosfat, dinatrijeva sol |
| DFT | QM funkcional/metoda (engl. <i>Density Functional Theory</i>) |
| DNA | deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i>) |
| ds-DNA | dvostruka uzvojnica DNA (engl. <i>double stranded DNA</i>) |
| ds-RNA | dvostruka uzvojnica RNA (engl. <i>double stranded RNA</i>) |
| EE | elektrostatsko uklapanje (engl. <i>Electronical Embedding</i>) |
| ESP | elektrostatski potencijal |
| G | purinska dušična baza guanin |
| GMP | gvanozin-5'-monofosfat, dinatrijeva sol |
| HCV | hepatitis C virus |
| HF | QM funkcional/metoda (engl. <i>Hartree-Fock</i>) |
| ICD | inducirani cirkularni dikroizam (engl. <i>Induced Circular Dichroism</i>) |
| IRES | dio RNA koji ulazi u ribosomsku jedinicu domaćina (engl. <i>Internal Ribosomic Entry Site</i>) |
| ME | mehaničko uklapanje (engl. <i>Mechanical Embedding</i>) |
| MD | molekulska dinamika (engl. <i>Molecular Dynamics</i>) |
| MM | molekulska mehanika (engl. <i>Molecular Mechanics</i>) |
| MM_PBSA | metoda za račun slobodne energije vezanja (engl. <i>Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Solvent Accessible Area</i>) |
| NMR | spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije |
| NPT | izotermno-izobarni ansambl |
| NVE | mikrokanonski asambl |
| NVT | kanonski ansambl |
| ONIOM | QM/MM metoda (engl. <i>Our own N-layerd Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics</i>) |

| | |
|--|---|
| PBC | periodični rubni uvjeti (engl. <i>Periodic Boundary Conditions</i>) |
| PCM | metoda za simuliranje prisutnosti otapala (engl. <i>Polarisable Continuum Model</i>) |
| PDB | proteinska baza podataka (engl. <i>Protein Data Bank</i>) |
| PME | metoda za računanje elektrostatskih interakcija (engl. <i>Particle Mesh Ewald</i>) |
| poli A | jednolančani polinukleotid sastavljen od adenina |
| poli U | jednolančani polinukleotid sastavljen od uracila |
| poli A-pol U | dvolančani homopolinukleotid sastavljen od adenina i uracila |
| poli AH ⁺ -poli AH ⁺ | dvolančani polinukleotid sastavljen od protoniranih adenina |
| poli dA-pol dT | dvolančana DNA sastavljena od adenina i timina |
| QM | kvantna mehanika (engl. <i>Quantum Mechanics</i>) |
| QM/MM | kvantno mehanički – molekulsko mehanički |
| RMSD | usrednjeni korijen kvadrata odstupanja (engl. <i>Root Mean Square Deviation</i>) |
| SASA | površina dostupna otapalu (engl. <i>Solvent Accessible Surface Area</i>) |
| UV-Vis | ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija |

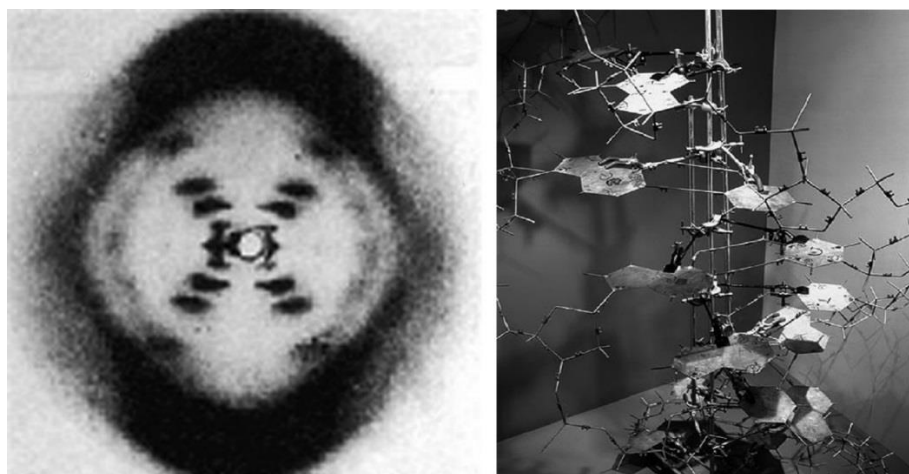
1. UVOD

Nukleinske kiseline su biomakromolekule koje sadrže genetičke informacije te se zbog toga smatraju ključnim molekulama života. Pored pohranjivanja i prijenosa genetičkih informacija, sudjeluju i u sintezi proteina te u nizu metaboličkih procesa unutar stanice.

Otkriće nukleinskih kiselina seže u 1869. godinu kada je švicarski liječnik Friedrich Miescher iz bijelih krvnih zrnaca izolirao supstancu koju je nazvao *nuclein* (lat. *nucleus* = jezgra) [1], a koja se od bjelančevina razlikovala po visokom udjelu fosfora. 1898. godine njegov učenik Richard Altmann otkrio je *nuclein* i u biljnim stanicama i na osnovu kemijskog sastava nazvao isti „nukleinska kiselina“. Smatrano je da se dana supstanca nalazi samo u kromosomima (danas se zna da postoji i izvan kromosoma, npr. u ribosomima). Znanstvenik Frederick Griffith provodio je 1928. godine eksperimente u kojima je istovremeno ubrizgavao „mrtve“ (umrtnjene visokom temperaturom) infektivne i ne-infektivne („žive“) bakterijske uzročnike upale pluća u miševe. Opazio je da su „mrtve“ infektivne bakterije upale pluća prenijele genetski materijal u ne-infektivne nakon čega su se iste „transformirale“ u infektivne i uzrokovale bolest. Tu pojavu nazvao je „transformacija“ i pripisao ju „molekuli nasljeđa“. Desetak godina kasnije Oswald Avery nastavio je dani eksperiment kako bi ustanovio što je točno „molekula nasljeđa“. Uništio je lipide, ribonukleinske kiseline, ugljikohidrate i proteine bakterijskog uzročnika upale pluća, a pokus je ponovio s preostalim materijalom. Transformacija je bila i dalje prisutna. Tek nakon što je uništio deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA) došlo je do izostanka procesa prijenosa genetskih informacija, te je na temelju toga zaključio da upravo deoksiribonukleinska kiselina predstavlja temelj nasljeđivanja.

1929. godine znanstvenik Phoebus Levene identificirao je građevne jedinice molekule DNA i pokazao da su šećer, fosfat i nukleobaze: adenin (A), citozin (C), guanin (G) i timin (T), povezane kao šećer-fosfat-baza [1]. Takvu jedinicu nazvao je nukleotid te predložio da se DNA promatra kao niz nukleotida povezanih fosfatnim skupinama, pri čemu šećeri i fosfati čine okosnicu molekule. Levene je vjerovao da je taj lanac kratak i da se baze ponavljaju u identičnom redoslijedu, no znanstvenici Torbjorn Caspersson i Einar Hammersten pokazali su da je DNA polimer. Kako bi što bolje razumjeli funkciju molekule DNA, znanstvenici su nastojali napraviti njezin model. Četrdesetih godina prošlog stoljeća Erwin Chargaff otkrio je, na temelju uzoraka DNA iz različitih stanica, da količina adenina odgovara količini timina, a guanina citozinu. 1952. godine znanstvenica Rosalind Franklin i znanstvenik Maurice Wilkins snimili su molekulu DNA metodom difrakcije X-zraka (slika 1). Na temelju dobivenih rezultata

R. Franklin je zaključila da se fosfatne skupine moraju nalaziti s vanjske strane molekule. Snimljene fotografije pokazale su da je DNA građena u obliku dvostruke uzvojnice. Dani model poslužio je znanstvenicima Jamesu Watsonu i Francisu Cricku da 1953. godine naprave model DNA koji se, u tek neznatno promijenjenom obliku, i danas koristi. Možemo reći da je to bio početak „modeliranja“ nukleinskih kiselina. Zaključili su da se molekula DNA sastoji od dva lanca nukleotida, oba spiralno zavijena oko zajedničke osi, ali međusobno suprotno usmjerena – komplementarna, te da se dušikove baze (nukleobaze) dvaju lanaca spajaju vodikovim vezama, tako da u unutrašnjosti zavojnice nasuprot adenina iz jednog lanca uvijek stoji timin iz drugog, a nasuprot guanina, citozin. Vanjski kostur zavojnice čine fosfatne skupine i šećeri, a na svaki je šećer s unutrašnje strane vezana po jedna dušikova baza. Kako bi vizualizirali pretpostavljeni izgled DNA, Watson i Crick sagradili su danas slavni model od priručnog materijala – aluminijskih pločica i laboratorijskih hvataljki (slika 1). Također, otkrili su da se između dvaju parova baza stvaraju vodikove veze. Njihov teorijski model kasnije su eksperimentalnim rezultatima potvrdili i nadopunili mnogi drugi istraživači. Zanimljivo je da u novije vrijeme postoje visokosofisticirani pisari koji omogućuju trodimenzionalan ispis preciznih modela nukleinskih kiselina dobivenih bilo eksperimentalno, difrakcijom X-zraka na monokristalima, bilo korištenjem računalnih metoda.



Slika 1. Lijevo: Snimka strukture DNA dobivena difrakcijom X-zraka. Desno: Prvi model dvostruke uzvojnice DNA načinjen od hvataljki i aluminijskih pločica (preuzeto iz <http://lebbeuswoods.wordpress.com/2010/08/30/structure-of-life/>).

Nukleinske kiseline predmet su intenzivnih istraživanja širokog opsega. Prepisivanje nukleinskih kiselina početni je korak u sintezi bjelančevina, osnovnih građevnih jedinica svih živih bića. Međudjelovanje nukleinskih kiselina i malih molekula intenzivno se istražuje radi

razvoja novih lijekova (antitumorskih, antivirusnih), molekulskih označivača i slično. Radi selektivnog blokiranja prepisivanja određenih dijelova nukleotidnih nizova sintetiziraju se nove molekule koje se specifično vežu za DNA ili RNA.

Molekulsko prepoznavanje nukleinskih kiselina granično je područje kemije, fizike i medicine, pri čemu računalno modeliranje molekula, kao jedna od metoda, omogućuje neposredno istraživanje, a time i uvid u strukturu i dinamička svojstva nukleinskih kiselina i njihovih kompleksa. Računalne simulacije nukleinskih kiselina započele su prije otprilike dvadeset i pet godina. Iako se već ranije pokušalo opisati nukleinske kiseline koristeći metode polja sila, intenzivno modeliranje započinje 1990-tih značajnim napretkom računala. U to vrijeme pojavila su se i prva polja sila „druge generacije“ za nukleinske kiseline. Ključnu ulogu u vjerodostojnosti tih simulacija imalo je otkriće *particle mesh Ewald* (PME) metoda za tretiranje dalekosežnih elektrostatskih interakcija [2,3], kao i dostupnost efikasnih i paraleliziranih simulacijskih kodova [4]. Brojnim i dugotrajnim računima, testirani su parametri i modificirana polja sila te razvijene razne metode za tretiranje *in silico* promatranih sustava.

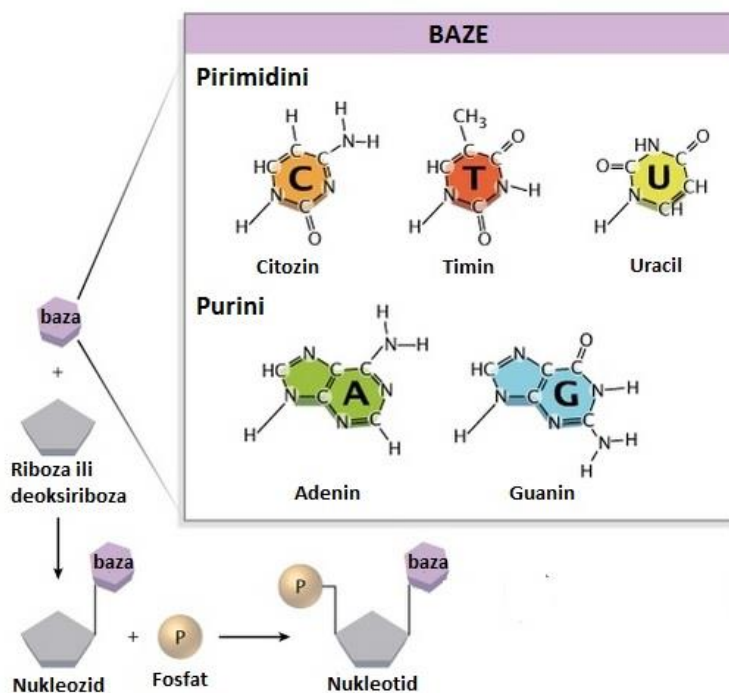
Dosadašnja istraživanja omogućila su dobro definiranje polja sila za DNA i RNA, te za pojedine, najraširenije tipove sintetičkih polinukleotidnih lanaca [5]. Isto tako, rješavanjem sličnih problema u dosadašnjim istraživanjima unaprijeđeni su alati za modeliranje i analize.

U ovom radu, metodama molekulskog modeliranja, proučavane su interakcije nukleinskih kiselina s nekoliko vrsta malih molekula u svrhu interpretacije eksperimentalnih rezultata, razvijeni su parametri za dvostruku protoniranu uzvojnica RNA poli rAH⁺-poli rAH⁺ i istražene male molekule koje posjeduju svojstvo selektivnog vezanja na određene sljedove i specifične strukture nukleinskih kiselina. Proučavana je plastičnost RNA IRES subdomene Ila te utjecaj okoline, mutacija i vezanja različitih liganada na njezina svojstva, kao što su oblik strukture, stabilnost i fleksibilnost.

Kako bi se neka bolest mogla liječiti nužno je detaljno poznavanje staničnih procesa koji se u konačnici zasnivaju na međudjelovanju proteina, proteina i nukleinskih kiselina te jednih i drugih s malim molekulama, hormonima, vitaminima i lijekovima. Molekulsko modeliranje ima veliku ulogu u praćenju i analizi tih procesa. Spektroskopski i difrakcijski rezultati nadopunjeni računalnim modelima pružaju točniju i precizniju sliku sustava. Tako su moderna industrija lijekova, biologija, kemija, biofizika i medicina danas nezamislive bez molekulskog modeliranja.

2. LITERATURNI PREGLED

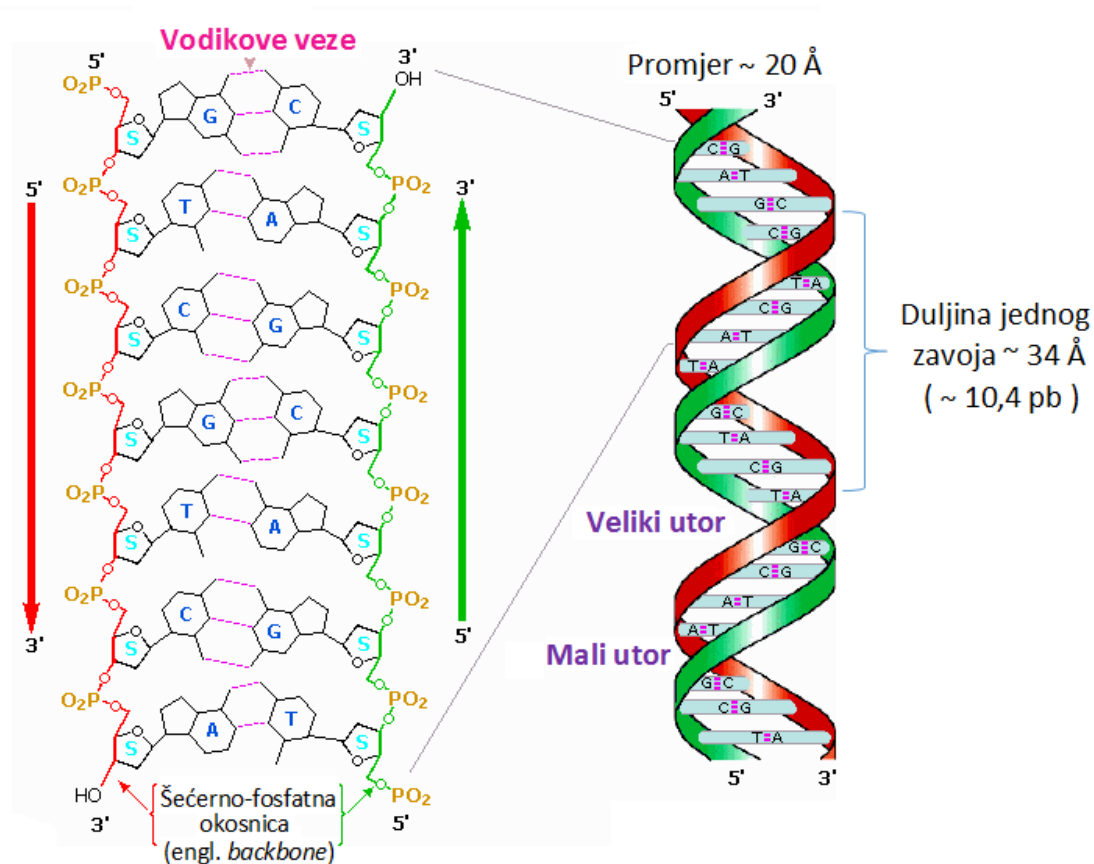
Nukleinske kiseline su polinukleotidi izgrađeni od heterocikličkih baza (purinskih i pirimidinskih), ugljikohidrata i fosfatne kiseline (slika 2). Prema vrsti ugljikohidrata, razlikujemo deoksiribonukleinske kiseline (DNA – engl. *Deoxyribonucleic Acid*) i ribonukleinske kiseline (RNA – engl. *Ribonucleic Acid*). Dok DNA sadrži deoksiribozu, kod RNA nalazimo šećer ribozu. Vanjsku okosnicu nukleinske kiseline, nepromjenjivu duž cijele molekule, čine šećerne podjedinice međusobno povezane preko negativno nabijenih fosfatnih skupina (tzv. fosfodieterskim vezama), što okosnicu šećer-fosfat čini hidrofilnom. Hidrofobne baze smještene su u unutrašnjosti uzvojnice). Vodikove veze koje povezuju baze komplementarnih lanaca (tzv. komplementarne parove baza) uvijek nastaju na isti način – purin s jednog lanca veže se s pirimidinom na komplementarnom lancu. Adenin uvijek s timinom stvara dvije, a guanin s citozinom tri vodikove veze (slika 3). Upravo ta specifičnost pri sparivanju baza je najvažnije svojstvo dvostruke zavojnice DNA. Slijed baza duž polinukleotidnog lanca nije ni s čime ograničen i čini promjenjivi dio molekule. Dok su purinske i pirimidinske baze nositelji genetičke informacije koja je zapisana u njihovom redoslijedu, šećer i fosfati imaju strukturnu ulogu. RNA je za razliku od DNA većinom jednostruko uvijena i ima kraći lanac nukleotida.



Slika 2. Dušične baze i građa nukleotida (preuzeto iz [1] i prerađeno).

Za razliku od deoksiriboze, šećer riboza ima na položaju 2' šećernog prstena hidroksilnu skupinu, što čini RNA podložnijom hidrolizi od DNA i time manje stabilnom molekulom od DNA. Umjesto timina kod RNA nalazimo uracil (nemetilirani oblik timina). Biološki aktivne RNA (mRNA, tRNA, rRNA) sadrže, kao i DNA, komplementarne sekvence preko kojih se dijelovi RNA mogu međusobno povezivati stvarajući dvostruke uzvojnice. Tako nastaju složene strukture sastavljene od mnogo povezanih malih uzvojnica čime podsjećaju na strukturu bjelančevina.

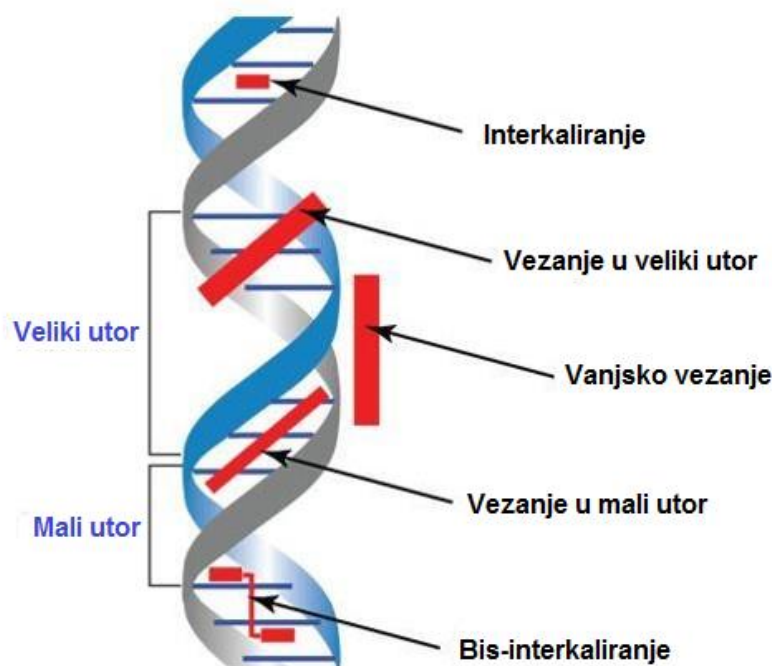
Sami nukleotidi imaju različite važne funkcije u stanici. Osim što su osnovne građevne jedinice DNA i RNA, važni su prenositelji kemijske energije (ADP (adenozin-di-fosfat) i ATP (adenozin-tri-fosfat) energetski su bogate molekule i imaju ključnu ulogu u brojnim metaboličkim procesima) i sastavni su dijelovi važnih koenzima, kao npr. NAD^+ , FAD i CoA, te sl. Zbog biološke važnosti nukleotida, molekulsko prepoznavanje nukleobaza od kojih se nukleotidi sastoje područje je koje se intenzivno istražuje. Također, takvi receptori, sa svojstvom prepoznavanja uobičajenih nukleobaza, sintetiziraju se i istražuju radi selektivnog blokiranja određenih sljedova nukleinskih kiselina.



Slika 3. Dvostruka uzvojnica DNA (preuzeto iz [6] i prerađeno).

Fizikalna i kemijska svojstva nukleinskih kiselina te njihove interakcije s malim organskim molekulama (ligandima) predmet su intenzivnih znanstvenih istraživanja. Pod pojmom malih molekula podrazumijevamo one koje se sastoje od stotinjak (maksimalno dvije do tri stotine) atoma.

Najčešći oblik međudjelovanja malih organskih molekula s dvostrukom uzvojnica DNA/RNA je nekovalentno vezanje. Ligande razlikujemo prema dominantnom načinu njihovog vezanja za nukleinske kiseline, a to su: interkaliranje (umetanje između parova baza), vezanje u mali ili veliki utor i elektrostatsko međudjelovanje [7] (slika 4).



Slika 4. Načini vezanja malih molekula na DNA.

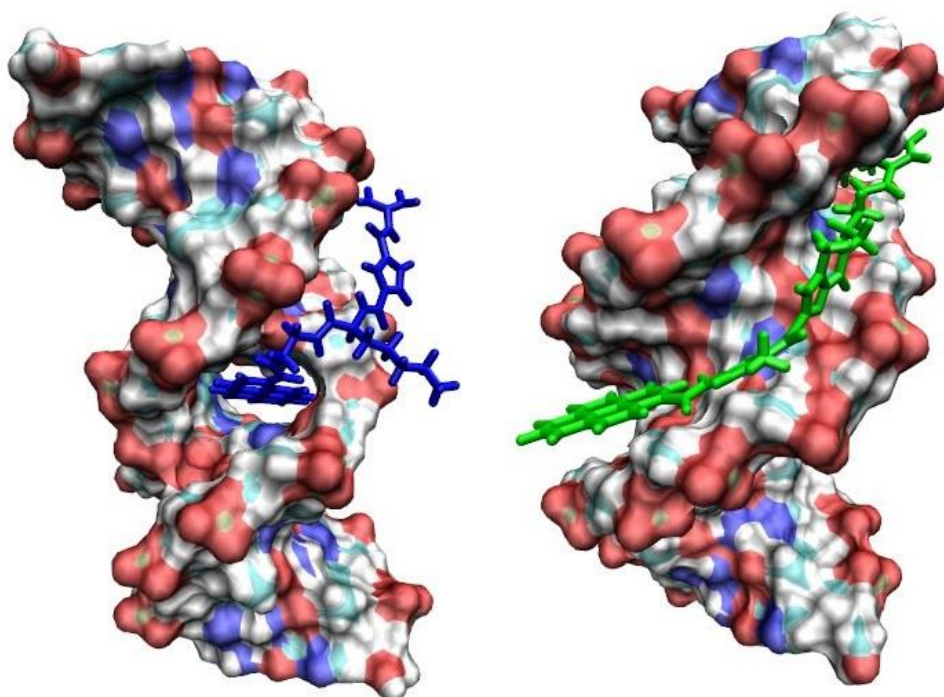
Proces interkaliranja odnosi se na umetanje planarnog aromatskog ili heteroaromatskog dijela molekule, između susjednih parova baza u dvolančanu nukleinsku kiselinu, čime se uspostavljaju tzv. π - π interakcije malih molekula s nukleobazama. Interkalativni način vezanja ima ključnu ulogu u načinu djelovanja mnogih klinički primijenjenih antitumorskih lijekova (amsakrin, elipticin, daunomicin, adriamicin) te nekih antibiotika (aktinomicin D, nogalamycin i derivati), blokirajući djelovanje topoizomeraze II [7]. Interkaliranje organskih molekula u polinukleotide dovodi do promjene u raspodjeli elektrona na susjednim bazama, što rezultira promjenama absorpcijskih UV-Vis i fluorescentnih spektara te dani spojevi mogu poslužiti kao markeri u biološkim i biokemijskim istraživanjima. Općenito, interkaliranje molekule u polinukleotidni lanac uzrokuje njegovo produljenje, a ponekad i djelomično odmotavanje i deformaciju [8]. No, vezanje interkalatora ujedno i stabilizira i ukrućuje polinukleotidni lanac.

Drugi spomenuti način međudjelovanja malih molekula s dvolančanim DNA ili RNA je njihovo vezanje u manji utor. Niz antibiotika i antitumorskih lijekova temelji svoje terapijsko djelovanje na spomenutom modelu vezanja. Konveksni oblik molekule, karakterističan za tu skupinu spojeva, odgovara konkavnom obliku utora dvostrukih uzvojnica DNA ili RNA, dok raspored pozitivnih naboja u molekuli koja se veže u utor omogućuje povoljno elektrostatsko međudjelovanje s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida. Selektivnost tih spojeva, koji obično sudjeluju u biološkim procesima stanice [9,10], a time i njihova biološka aktivnost, ovisi o kombiniranom utjecaju vodikovih veza, van der Waalsovih i hidrofobnih te elektrostatskih interakcija s veznim mjestom polinukleotida [11], pri čemu jačina interakcija ovisi o broju i rasporedu pozitivnih naboja na ligandu. Molekulska modeliranje kompleksa nukleinskih kiselina sa spojevima važnim u medicini i biotehnologiji koristi se kao pomoć pri razvoju novih, učinkovitijih molekula (senzora, označivača, inhibitora).

Spojevi čije se međudjelovanje s nukleinskim kiselinama modeliralo u ovom istraživanju, mogu se podijeliti u nekoliko skupina: interkalatori, konjugati bisfenantridina, s posebnim naglaskom na bisfenantridinske spojeve koji su pokazali visoku selektivnost vezanja na protoniranu dvostruku uzvojnici RNA; guanidiniokarbonil-pirol-arilni konjugati koji se vežu u mali utor dvostruke uzvojnice DNA, a pojedini imaju i tendenciju interkaliranja; cijaninski spojevi za koje je karakteristično vezanje u obliku monomera i dimera u mali utor DNA; te translacijski (benzimidazolni i diaminopiperidinski) inhibitori hepatitis C virusa. Prve tri skupine spojeva imaju svojstvo molekulskog prepoznavanja nukleobaza, pa mogu poslužiti za razvoj specifičnih obilježivača pri istraživanju nukleinskih kiselina, te kao predložak za razvoj antitumorskih i antivirusnih lijekova sa svojstvom selektivnog blokiranja određenih sljedova DNA ili RNA. Dani spojevi sintetizirani su i eksperimentalno okarakterizirani na Institutu Ruđer Bošković (Laboratorij za studij interakcija biomakromolekula) i istraživanja prikazana u ovom radu su prve računalne simulacije njihovih kompleksa s nukleinskim kiselinama.

Kao predložak za modeliranje korišteni su rezultati spektroskopskih mjerenja (UV-Vis spektri, fluorimetrijske titracije) te difrakcijske i NMR analize [12-14]. U slučaju guanidiniokarbonil-pirol-arilnih konjugata korištena je, uz navedene metode, i CD spektroskopija kao visoko osjetljiva metoda za praćenje konformacijskih promjena sekundarne strukture polinukleotida [15]. Vezanje malih, akiralnih molekula na polinukleotide, može rezultirati induciranim CD spektrom (ICD), na temelju kojeg se mogu dobiti korisne informacije o načinu njihovog vezanja. Rezultati mjerenja upućivali su da se radi o spojevima

koji se vežu u utor dvostruke uzvojnice poli dAdT–poli dAdT, što je računalnim simulacijama potvrđeno, a za jedan je spoj utvrđen kombinirani način vezanja pri čemu dio molekule interkalira, a ostatak se veže u mali utor DNA. Dvije navedene skupine spojeva vezale su se na dvostruku uzvojnicu poli dAdT–poli dAdT (slika 5).



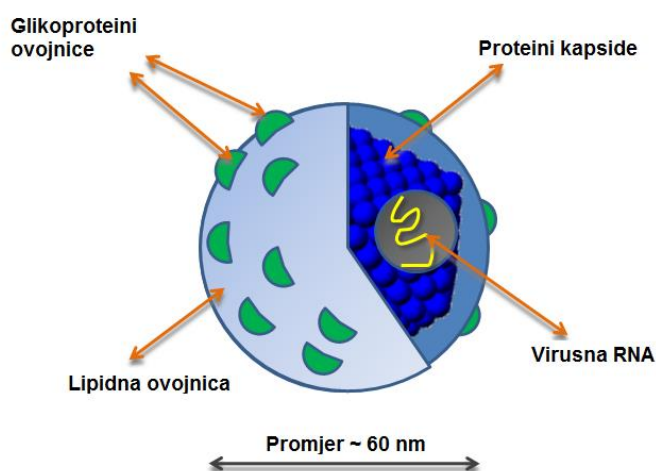
Slika 5. Primjeri vezanja male molekule na dvolančanu DNA. Lijevo: kombinirani način vezanja – interkaliranje pirenskog prstena i vezanje ostatka molekule u mali utor. Desno: Vezanje u mali utor.

Na temelju spektroskopskih rezultata predviđeno je vezanje cijaninskih spojeva u mali utor, pri čemu prilikom zasićenja dolazi do vezanja molekule u obliku dimera.

Za pojedine bisfenantridinske spojeve spektroskopska mjerenja su pokazala da stabiliziraju dvostruku uzvojnicu RNA sagrađenu od protoniranih adenina, poli AH⁺–poli AH⁺, a cilj našeg istraživanja bio je utvrditi moguće načine na koje je ta stabilizacija ostvarena. Budući da ne postoje eksperimentalno određene trodimenzionalne strukture takvih dvostrukih uzvojnica, sagradili smo ih pomoću specijaliziranih računalnih programa, a parametre potrebne za računalno simuliranje kompleksa odredili smo korištenjem kvantno mehaničkih metoda.



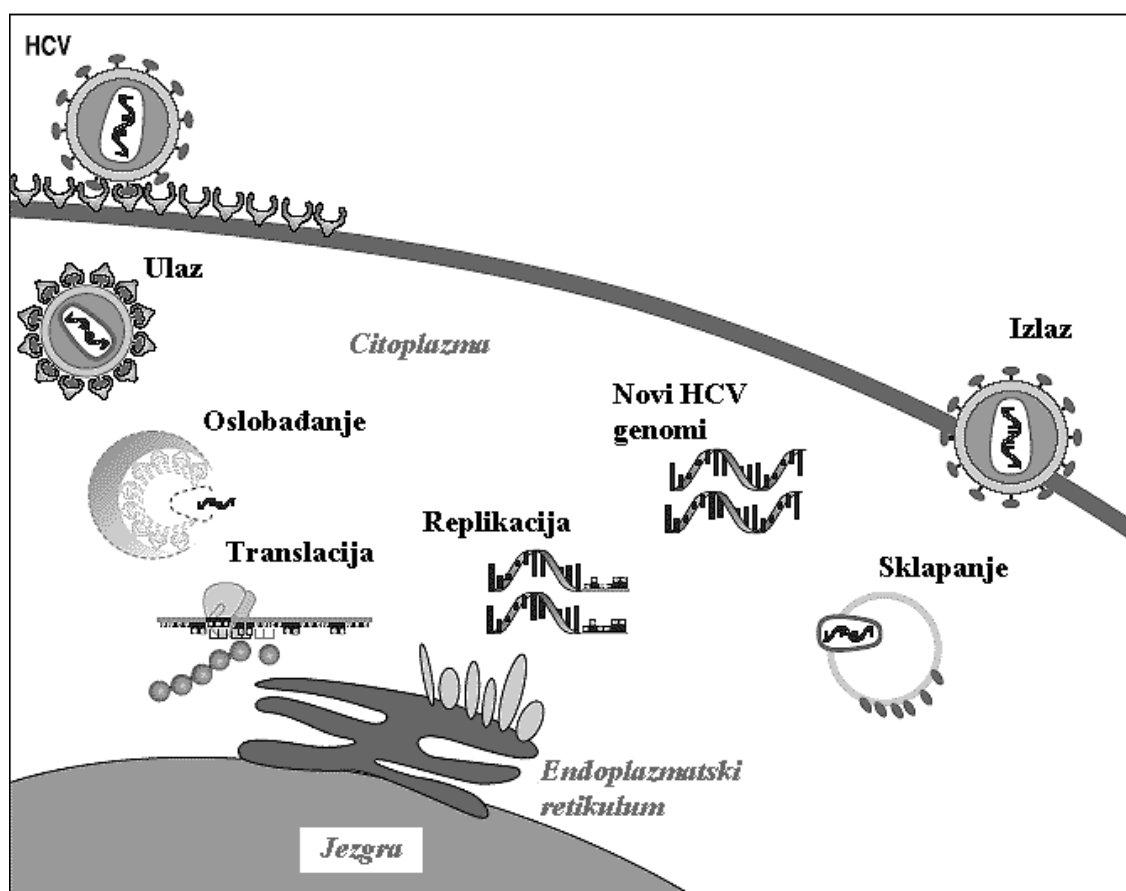
Slika 6. Hepatitis C virus (HCV) (preuzeto iz [16]).



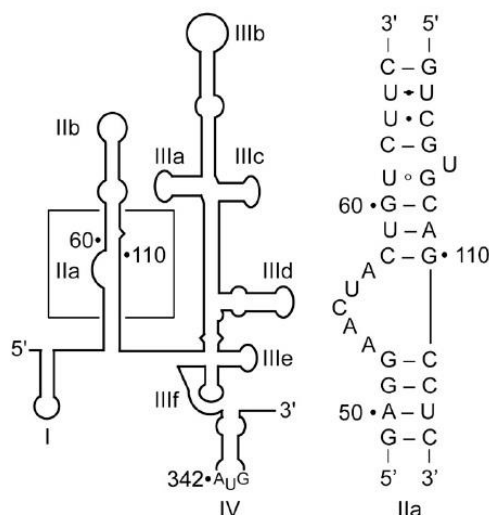
Slika 7. Građa HCV-a (preuzeto iz [17] i prerađeno).

U posljednjem dijelu poglavlja „Rezultati i rasprava“ prikazani su rezultati modeliranja na ribonukleinskoj kiselini hepatitis C virusa. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, infekcija hepatitis C virusom (HCV) (slika 6) ima pandemijske razmjere. Pretpostavlja se da je trenutno zaraženo oko 2,2% svjetske populacije (oko 170 milijuna ljudi), pri čemu se godišnje registrira oko 3 do 4 milijuna novo zaraženih pojedinaca [18,19]. Velika većina zaraženih HCV-om oboli od neke kronične bolesti. Tako je ustanovljeno da je kod 27% oboljelih od ciroze jetre i kod 25% oboljelih od hepatocelularnog karcinoma uzrok bolesti zaraza HCV-om [20]. Zbog toga je svako novo saznanje vezano uz inhibitore te bolesti vrlo važno. Dio RNA koji ulazi u ribosomsku jedinicu domaćina (IRES – engl. *Internal Ribosomal Entry Site*) [21,22] je, zbog svoje jedinstvene funkcije i visokog očuvanja u kliničkim izolatima virusa [23-26], važna meta za inhibitore koji bi trebali spriječiti daljnje umnožavanje HC virusa. Da bi došlo do umnožavanja, virus HC-a najprije ulazi u stanicu (endocitoza) (slika 8) na način da se glikoproteini iz njegove ovojnice (slika 7) vežu na stanične receptore. Zbog niskog pH u endosomu dolazi do konformacijskih promjena proteina ovojnice, fuzije virusa s membranom endosoma, te otpuštanja RNA koja vezanjem za ribosom domaćina kontrolira njegovu reorganizaciju i početak translacije. Funkcionalnost IRES domene ovisi o strukturnim svojstvima RNA [27,28] koja se sastoji od nekoliko neovisnih domena (slika 9). U ovom radu proučavana je IIa podjedinica IRES dijela virusne RNA. Eksperimentalna istraživanja su pokazala da je za provođenje translacije zaslužan L-oblik IIa podjedinice [29-31] koji omogućuje ispravno pozicioniranje podjedinice IIb u E-područje na granici dviju

ribosomskih podjedinica. Pridruživanje podjedinice II ribosomu uzrokuje konformacijsku promjenu ribosomske podjedinice 40S čime se zatvara vezno mjesto za mRNA. Ispravno pozicioniranje virusnog mRNA inicijacijskog kodona, kao i udruživanje ribosomskih podjedinica za formiranje funkcionalne 80S jedinice, direktno je ovisno o L-obliku domene II [32-35]. Ako je to zadovoljeno, dolazi do replikacije, čiji su produkt novi HCV genomi. Novosintetizirana virusna RNA spaja se s proteinima kapside i tvori nukleokapsidu. Virus dobiva lipidnu ovojnicu pupanjem kroz intracelularne vezikule te se oslobađa iz stanice (egzocitoza) (slika 8).



Slika 8. Mehanizam replikacije HCV-a (preuzeto iz [16] i prerađeno).



Slika 9. Sekundarna struktura HCV IRES RNA mete (nukleotidi 1-341 HCV genotipa 1b). Uokvireni dio na lijevom dijelu slike predstavlja subdomenu Ila, čija je sekvenca prikazana s desne strane (preuzeto iz [36]).

Nedavno je korištenjem difrakcije X-zraka određena trodimenzionalna struktura Ila podjedinice IRES-a u kompleksu s benzimidazolnim translacijskim inhibitorom (PDB oznaka: 3TZR [36]). Navedena struktura korištena je kao polazište za modeliranje nekoliko kompleksa podjedinice Ila s inhibitorima HCV-a, za koje se pretpostavlja da vezanjem za Ila reduciraju replikaciju virusa, te kompleksa s njihovim neaktivnim analogom [36]. Također, 3D struktura kompleksa Ila s benzimidazolnim inhibitorom određena je i NMR metodom [37], koja nam je u ovom radu poslužila za modeliranje subdomene Ila bez vezanog inhibitora, u raznom okolišu (PDB oznaka: 2KTZ [37]).

Pored benzimidazolnih inhibitora, ove godine identificirana je i druga vrsta translacijskih inhibitora kojima je, također, meta subdomena Ila, a nazivaju se diaminopiperidini (DAP derivati) [38]. Za razliku od benzimidazola koji se vežu na izduženu konformaciju subdomene Ila RNA, pretpostavlja se da DAP ligandi stabiliziraju savijeni oblik dane mete. Zaključavanje Ila RNA u savijenoj konformaciji inhibira IRES funkciju najvjerojatnije na način da se sprečava otpuštanje ribosoma [39]. 3D struktura kompleksa s vezanim DAP-om još nije određena. U ovom radu generirane su strukture danog kompleksa i provedene su MD simulacije za 3 moda vezanja inhibitora DAP na savijeni L-oblik Ila.

Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je razumijevanje eksperimentalnih, prvenstveno spektroskopskih, mjerenja u svrhu ciljanog razvoja novih, aktivnih molekula. Razvoj novih parametara za pojedine polinukleotide, kao i protokoli koji su razrađeni, optimizirani i dokumentirani, olakšati će daljnja istraživanja na sličnim sustavima. Detaljno istraživanje strukturnih i dinamičkih svojstava nukleinskih kiselina i sintetičkih polinukleotida, te njihovih kompleksa s organskim molekulama, metodama molekulskog modeliranja, pridonijeti će razumijevanju njihovog međudjelovanja i tako pomoći u dizajniranju inhibitora HCV-a, te polinukleotidnih (DNA/RNA) označivača s poboljšanim svojstvima.

3. RAČUNALNE METODE

Modeliranje molekula podrazumijeva proučavanje strukture i svojstava molekula korištenjem teorijskih metoda. Računalne metode možemo podijeliti na empirijske, koje se zasnivaju na upotrebi polja sila, te *ab initio* i semiempirijske, koje počivaju na kvantno mehaničkim principima. U ovom istraživanju korištene su kvantno mehaničke metode u svrhu određivanja parametara, metode polja sila (molekulska mehanika, molekulska dinamika) za proučavanje strukture, fleksibilnosti i stabilnosti nukleinskih kiselina i njihovih kompleksa s organskim molekulama, te kombinirane kvantno mehaničke – molekulske mehaničke metode za što točnije izračunavanje energija interakcije i praćenje promjena raspodjele naboja na ligandu uslijed vezanja za nukleinsku kiselinu.

3.1. Empirijske metode

Empirijskim metodama moguća je analiza velikih molekula i sustava [40], a nazivaju se još i metode polja sila. Zasnovane su na eksperimentalno dobivenim (empirijskim) parametrima. U danim metodama energija se izračunava kao funkcija međusobnih položaja atoma (jezgri) pri čemu se elektroni ne promatraju eksplicitno nego se različitim parametrima nastoje opisati efekti koje stvaraju. Unutarnje koordinate su veličine kojima se opisuje geometrija molekule: duljina veze, vrijednosti valentnih i torzijskih kutova i ne-vezne udaljenosti. Vrijednostima tih koordinata opisan je prostorni raspored atoma u molekulama čime je definirana njezina konformacija (oblik molekule) [41]. Uslijed intramolekulskih i intermolekulskih interakcija dolazi do odstupanja vrijednosti unutarnjih koordinata od njihove referentne (nulte) vrijednosti što rezultira promjenom konformacije i potencijalne energije molekule, te sustava.

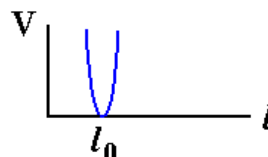
3.1.1. Polje sila

Polje sila predstavlja skup parametara koji se pridružuju različitim tipovima atoma i funkciju koja korištenjem tih parametara omogućava računanje potencijalne (steričke, konformacijske) energije molekule na temelju njezine geometrije. Parametre atoma određuje njihova hibridizacija i položaj u molekuli, odnosno pripadnost određenoj funkcionalnoj jedinici. U skup parametara uključenih u polje sila spadaju ravnotežne vrijednosti duljina veza, valentnih i torzijskih kutova, zatim konstante sila, tj. visine barijera koje definiraju promjenu

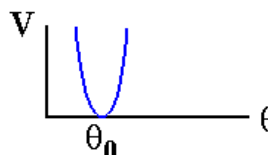
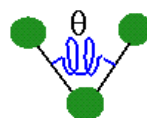
potencijalne energije do koje dolazi promjenom pojedinih strukturnih veličina, te nadalje, naboji, mase i radijusi atoma. Parametri mogu biti dobiveni eksperimentalno (polja sila „prve generacije“) i pomoću složenijih kvantno mehaničkih računa (polja sila „druge generacije“). Ključna pretpostavka za korištenje polja sila je prenosivost parametara, tj. parametri izvedeni na određenom skupu molekula mogu poslužiti za opisivanje njima sličnih molekula. Prenosivost omogućuje apliciranje skupa parametara, određenih i testiranih na relativno malom broju slučajeva, na puno širi doseg problema, a također, parametri određeni iz podataka za male molekule mogu se koristiti za proučavanje puno većih molekula [42]. Opće je prihvaćena tvrdnja da se polje sila, izvedeno na određenom skupu molekula, može koristiti za opisivanje njima sličnih molekula [43].

istežanje veze

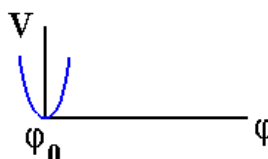
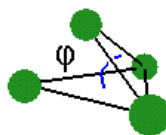
$$V(l) = \frac{k_l}{2} (l - l_0)^2$$

**promjena valentnog kuta**

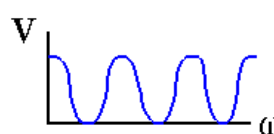
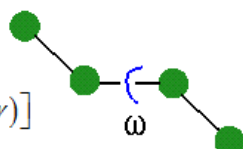
$$V(\theta) = \frac{k_\theta}{2} (\theta - \theta_0)^2$$

**odstupanje od ravnine**

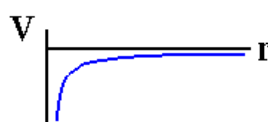
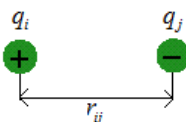
$$V(\varphi) = \frac{k_\varphi}{2} \varphi^2$$

**promjena torzijskog kuta**

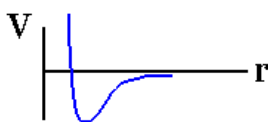
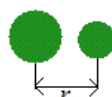
$$V(\omega) = \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\omega - \gamma)]$$

**elektrostatske interakcije**

$$V(r) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$$

**van der Waalsove interakcije**

$$V(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$



Slika 10. Članovi u izrazu za potencijalnu energiju molekule i prikaz interakcija koje opisuju (preuzeto iz [44] i prerađeno).

U slučaju korištenja polja sila za sve atome (engl. *All-atom force field*) svaki pojedini atom razmatra se kao zasebna čestica kojoj su dodijeljeni naboj, masa i radijus (najčešće van der Waalsov). Funkcija kojom se računa potencijalna energija molekule sastavljena je od niza doprinosa (slika 10), tj. potencijala koji se javljaju u molekuli kao posljedica odstupanja internih koordinata (vaza i kutova) od referentnih ili ravnotežnih vrijednosti, te ne-veznih interakcija: elektrostatskih (najčešće se računaju prema Coulombovom zakonu) i van der Waalsovih (najčešće se računaju korištenjem Lennard-Jonesove funkcije).

Izraz za potencijalnu energiju sustava u sklopu polja sila koje se može koristiti za modeliranje molekula ili ansambla atoma i/ili molekula ima sljedeći općeniti oblik:

$$V(r^N) = \sum_{\text{veze}} \frac{k_l}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{kutovi}} \frac{k_\theta}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torzije}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\ + \sum_i^N \sum_j^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (3.1)$$

$V(r^N)$ predstavlja potencijalnu energiju kao funkciju položaja (r) N čestica (najčešće atoma). Prvi član u jednadžbi (3.1) predstavlja međudjelovanje između parova kovalentno vezanih atoma i modeliran je harmoničkim potencijalom koji daje prirast energiji prilikom odstupanja duljina veza l_i od njihovih referentnih vrijednosti $l_{i,0}$. Referentna duljina veze ona je vrijednost koju veza poprima kada su svi ostali doprinosi potencijalnoj energiji nula, dok je ravnotežna duljina veze ona vrijednost koju veza ima u strukturi minimuma energije, čemu doprinose i svi ostali članovi izraza za energiju [42]. Konstanta k_l je parametar koji predstavlja konstantu sile ($\text{kcal mol}^{-1} \text{\AA}^{-2}$). U blizini minimuma potencijalne energije postoji i doprinos anharmoničkih članova pa neka polja sila za opis potencijala uslijed istezanja veze, osim izraza za harmonički oscilator, koriste i složeniji izraz za anharmonički potencijal (Morseov potencijal [45]):

$$V(l) = D \left\{ e^{-\alpha(l-l_0)} - 1 \right\}^2 - D \quad (3.2)$$

gdje je D energija disocijacije molekule, α je parametar koji određuje strminu krivulje potencijalne energije i ovisi o tipu atoma. Razlika između harmoničkog i anharmoničkog potencijala očituje se tek pri jačem istezanju veze. Najčešće je izraz za harmonički potencijal dovoljan za opisivanje istezanja veze jer su veze između atoma uglavnom blizu ravnotežne vrijednosti.

Drugi član u izrazu (3.1), također oblika harmoničkog potencijala, odnosi se na doprinos energiji ($\propto k_\theta$) uslijed odstupanja valentnih kutova (kut između tri kovalentno povezana atoma) od referentnih vrijednosti (θ_0). Za deformaciju kuta potrebno je znatno manje energije nego za istezanje ili kompresiju kovalentne veze pa su vrijednosti konstante sile, k_θ , puno manje. Treći član opisuje promjenu potencijalne energije uslijed promjene torzijskog (dihedralnog) kuta između četiri kovalentno povezana atoma, a prikazuje se kao rotacija oko središnje veze. To je periodična funkcija (slika 10) pri čemu je V_n rotacijska barijera, a n njezin multiplicitet (broj točaka minimuma funkcije uslijed rotacije veze), ω je vrijednost torzijskog kuta, a γ pomak u fazi (predstavlja točke minimuma torzijskog potencijala). Kod polinukleotida postoji šest torzijskih kutova (za koje vrijedi da je središnja veza jednostruka) po pojedinom nukleotidu duž okosnice, što utječe na složenost analize konformacijske promjene, (npr. kod polipeptida nalazimo po dva torzijska kuta na okosnici po aminokiselinu).

Pored navedenih veznih članova, u nekim poljima sila uzima se u obzir i potencijal koji opisuje izvanravninska odstupanja, npr. u slučaju planarnih prstenova (slika 10).

Četvrti doprinos u izrazu (3.1) je ne-vezni doprinos potencijalnoj energiji sustava. Izračunava se između svih parova atoma (i i j) u različitim molekulama ili u istoj molekuli u slučaju kada su razdvojeni s najmanje tri kovalentne veze u nizu. Elektrostatska interakcija sustava računa se kao zbroj interakcija između svih parova parcijalnih atomskih naboja q_i , q_j , pri čemu N predstavlja ukupan broj ne-veznih parova atoma u sustavu, a ε je dielektrična konstanta. Dielektrična konstanta je makroskopsko svojstvo medija, no kod molekulskog modeliranja njoj se pridaje lokalni karakter. Kada razmatramo naboje u vakuumu, kao dielektrična konstanta koristi se permitivnost vakuumu $\varepsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \text{C}^2/\text{Nm}^2$. Međutim, kada naboji nisu u vakuumu i nalaze se na maloj udaljenosti tako da broj čestica otapala među njima nije dostatan velik da bi simulirao makroskopska svojstva tog medija, upotrebljava se dielektrična konstanta koja je prostorno ovisna. Tom prilikom vrši se njezina korekcija s obzirom na udaljenost na kojoj se naboji nalaze [41]:

$$\varepsilon = \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_c}{r_{\text{eff}} - r_{\text{con}}} (r - r_{\text{con}}) + \varepsilon_c \quad (3.3)$$

gdje je ε_c vrijednost dielektrične konstante ε pri najmanjoj udaljenosti na kojoj se naboji mogu naći (r_{con}), a ε_0 vrijednost koja se uzima kada su naboji na dovoljnoj udaljenosti da možemo koristiti makroskopsko svojstvo medija ($r = r_{\text{eff}}$).

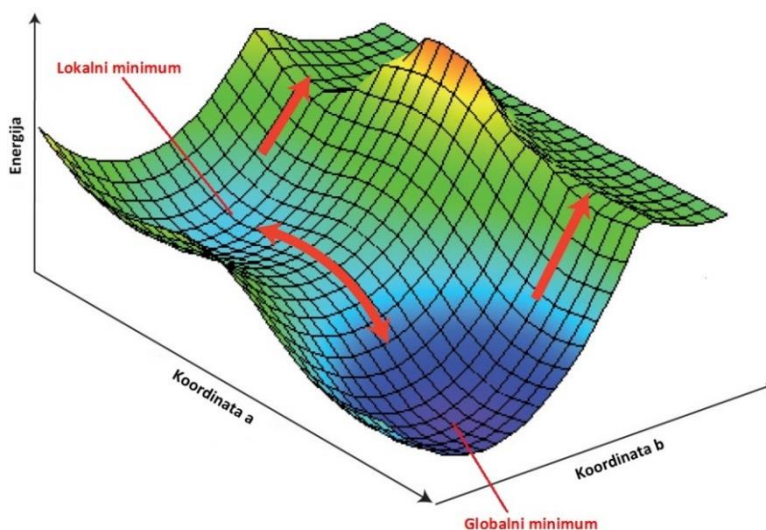
Van der Waalsovo međudjelovanje je u poljima sila koja su korištena u ovom radu prikazano preko Lennard-Jonesovog potencijala [46] koji sadrži dva podesiva parametra: udaljenost σ na kojoj je intermolekulski potencijal između dviju čestica nula i dubinu potencijalne jame ε (mjera koliko jako čestice međusobno interagiraju) u položaju $r_0 = \sigma\sqrt[6]{2}$.

Danas postoji niz polja sila za različite vrste molekula, razvijenih na temelju radova S. Lifsona i A. Warshela [47]. Njihova specifičnost očituje se u izboru funkcija kojima se energija opisuje te o skupu atoma za koje je provedena parametrizacija. Općenita polja sila posjeduju parametre za veliki broj tipova atoma dok su specijalizirana polja sila optimizirana upravo za određenu skupinu spojeva za koje posjeduju precizne parametre.

U ovom radu korišteno je polje sila ff99SB [5] koje se pokazalo najprikladnije za modeliranje polinukleotida, te GAFF (engl. *General Amber Force Field*) [48] i ff03 [5] za male organske molekule (sva tri unutar programa AMBER [49-51]). Parametri koji nisu bili poznati (kao npr. za protoniranu dvostruku uzvojnica RNA, poli rAH⁺-poli rAH⁺), izračunati su kvantno mehaničkim pristupom, tj. pomoću *ab initio* Hartree-Fock (HF) [52] računa uz korištenje odgovarajućeg baznog skupa, na način da se dobiveni parametri usklade s postojećima u ff99SB i GAFF poljima sila.

3.1.2. Molekulska mehanika

Molekulska mehanika (MM) je računalna metoda za optimizaciju geometrije molekule. Geometrijske veličine, kojima su molekule opisane, kao i njihovi međusobni položaji, približavaju se ravnotežnim vrijednostima, što rezultira smanjenjem potencijalne energije, a to znači da će se molekula na plohi potencijalne energije „spustiti“ u lokalni minimum (slika 11). Potencijalna energija računa se rješavanjem jednadžbe polja sila (3.1). Lokalni minimum je točka na plohi potencijalne energije koja odgovara optimiziranoj strukturi, konformaciji molekule do koje se došlo optimizacijom njezinih internih koordinata i ovisi o polaznoj točki, za razliku od globalnog minimuma koji je svojstvo potencijalne plohe i ne ovisi o ishodištu minimizacije (slika 11). Postupak optimizacije makromolekulskih sustava provodi se uglavnom pomoću matematičkih metoda minimizacije energije koje koriste jednostruke derivacije funkcije za energiju, kao što su: *metoda najstrmijeg spusta* (engl. *The steepest descents method*) i *metoda konjugiranih gradijenata* (engl. *Conjugate gradients minimisation*), koje su korištene u ovom istraživanju. Dane metode mijenjaju koordinate atoma pomičući sustav sve bliže točki minimuma. Optimizacijom se smanjuje ukupna sila na svaki atom dok ne postane zanemariva.



Slika 11. 3D ploha potencijalne energije. Prikaz ovisnosti energije o dvije unutarnje koordinate (a i b) (preuzeto iz [53] i prerađeno).

3.1.2.1. Metoda najstrmijeg spusta

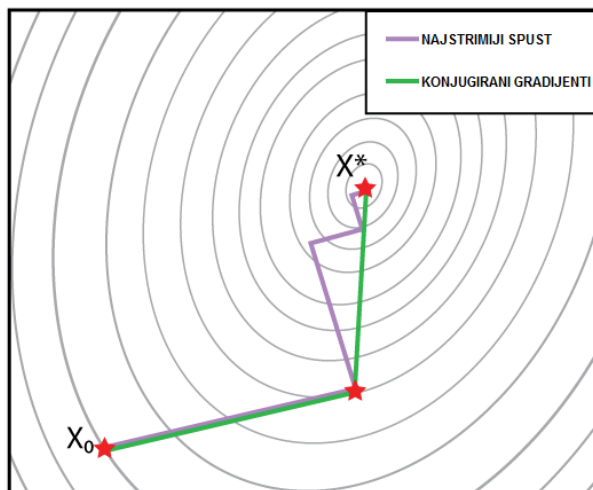
Metodom najstrmijeg spusta atomi se pomiču u smjeru djelovanja sile (geografski bi to značilo hodanje nizbrdo). Korak je proporcionalan negativnom gradijentu funkcije u danoj točki. Nakon odabranog smjera, potrebno je odrediti veličinu pomaka duž gradijenta. Algoritam metode najstrmijeg spusta najčešće se koristi za strukture koje se nalaze daleko od minimuma, jer se njime brzo uklanjaju velika odstupanja internih koordinata od ravnotežnih vrijednosti. Međutim, blizu minimuma sporo konvergira. U tom slučaju je metoda konjugiranih gradijenata učinkovitija. U ovom radu korištena je kombinacija tih dviju metoda.

3.1.2.2. Metoda konjugiranih gradijenata

Za razliku od najstrmijeg spusta, gdje su gradijenti i smjer u uzastopnim koracima nekorelirani, kod metode konjugiranih gradijenata smjerovi nemaju oscilatorno ponašanje, a gradijent i smjer sukcesivnih koraka su ortogonalni, odnosno smjer novog koraka je konjugirano ortogonalan na sve prethodne smjerove (tj. ortogonalan u smislu skalarnog produkta) (slika 12). Pri tome nije potrebno „pamtiti“ sve smjerove već samo prethodni. Dakle, svakim uzastopnim korakom se sve preciznije određuje smjer prema minimumu. Skup

konjugiranih smjerova ima svojstvo da će za kvadratnu funkciju od M varijabli, minimum biti postignut u M koraka.

Odabir metode minimizacije ovisi o veličini i stupnju optimiziranosti sustava. Za strukture koje se nalaze daleko od minimuma, najčešće se najprije koristi metoda najstrmijeg spusta jer je računalno manje zahtjevnja, a zatim i metoda konjugiranih gradijenata.



Slika 12. Usporedba dviju optimizacijskih metoda. X_0 – početna točka ne-optimizirane konformacije na plohi potencijalne energije; X^* - konačna točka na plohi potencijalne energije koja odgovara optimiziranoj konformaciji (preuzeto iz [54] i prerađeno).

3.1.3. Molekulska dinamika

Molekulska dinamika (MD), čija je osnovna ideja termičko pobuđenje sustava, je (u svom izvornom obliku deterministička) računalna metoda, kojom se, simuliranjem gibanja atoma u molekulama, nastoji opisati ponašanje molekula u realnom sustavu. Njome dobivamo detaljne informacije o fluktuacijama i konformacijskim promjenama molekula (proteina, nukleinskih kiselina itd.), tj. opisujemo vremenski ovisno ponašanje molekulskog sustava. Molekulska dinamika polazi od *Ergodske hipoteze* [55] prema kojoj ansambl konformacija, dobiven praćenjem jedne molekule tijekom dovoljno dugog razdoblja, odgovara raspodjeli konformacija u sustavu s velikim brojem istovrsnih molekula. Pod pojmom ansambl podrazumijevamo velik broj mikroskopski definiranih stanja sustava s određenim konstantnim makroskopskim svojstvima.

Prije samog provođenja produktivnih simulacija potrebno je odabrati početnu konfiguraciju sustava (iz eksperimentalnih podataka, teorijskog modela ili njihove

kombinacije) i stabilizirati ju optimizacijom (molekulska mehanika). Da bi dobili što realnije uvjete (u skladu s biološkima), dani sustav se promatra u zadanom okolišu, pri temperaturi i tlaku koji odgovaraju eksperimentalnim uvjetima. Sustav se zagrijava tako što mu se pridružuje određena kinetička energija, pri čemu se početne brzine pridružuju atomima nasumično koristeći Maxwell-Boltzmannovu raspodjelu za željenu temperaturu:

$$p(v_i) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{3}{2}} 4\pi v_i^2 e^{-\frac{m_i v_i^2}{2k_B T}} \quad (3.4)$$

$$p(v_{ix}) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{1/2} e^{-\frac{m_i v_{ix}^2}{2k_B T}}$$

Maxwell-Boltzmannova jednadžba (3.4) daje nam vjerojatnost p da atom i mase m_i na temperaturi T , ima x komponentu brzine iznosa v_{ix} (k_B je Boltzmannova konstanta; $k_B = 1,3806488 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$). Nakon pridruženih početnih brzina prate se promjene sustava do kojih dolazi uslijed gibanja atoma.

Unutarnja kinetička energija sustava (uronjenog u kupku) K povezana je s njegovom temperaturom T na sljedeći način:

$$K = \frac{1}{2} k_B n_{DOF} T \quad (3.5)$$

gdje je k_B Boltzmannova konstanta, a n_{DOF} broj unutarnjih stupnjeva slobode.

Kroz određeni vremenski period atomi i molekule međudjeluju, a kao rezultat simulacija dobivamo trajektorije koje nam opisuju kako se položaji i brzine čestica u sustavu mijenjaju s vremenom. Interakcije atoma i molekula u danom sustavu opisane su izrazom za potencijalnu energiju (3.1). Iz trenutnih položaja atoma, njihovih brzina i ubrzanja koja dobivaju uslijed djelovanja sile $\vec{F} = -\frac{\partial V}{\partial \vec{r}}$, može se odrediti njihov raspored u prostoru u narednom trenutku.

Sila na pojedini atom dobije se deriviranjem izraza za potencijalnu energiju. Trajektorije atoma i molekula dobivaju se rješavanjem Newtonovih jednadžbi gibanja:

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \frac{d\vec{p}_i}{dt} \quad (3.6)$$

Dana jednadžba (3.6) opisuje gibanje čestice mase m_i duž koordinate \vec{r}_i pri čemu u tom smjeru na nju djeluje sila \vec{F}_i (\vec{a}_i je ubrzanje koje čestica dobiva uslijed djelovanja sile). Vremenska

promjena količine gibanja ($\vec{p} = m\vec{v}$) proporcionalna je sili i zbiva se u smjeru djelovanja sile. Sila koja djeluje na jedan atom u molekuli ovisna je o položaju tog atoma, ali i položajima svih ostalih atoma s kojima interagira što rezultira sustavom složenih, međusobno zavisnih jednadžbi gibanja za atome u molekuli. Sustav najčešće nema analitičko rješenje već je potrebno primijeniti numeričku integraciju. Najčešće se u tu svrhu koristi integracijski algoritam Verleta [56] i to tzv. *Velocity Verlet* metoda [57] koja nam daje položaje, brzine i ubrzanja u istom vremenskom intervalu:

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)(\Delta t)^2 \quad (3.7)$$

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{1}{2}[\vec{a}(t) + \vec{a}(t + \Delta t)]\Delta t \quad (3.8)$$

Iz jednadžbe (3.8) možemo vidjeti da su nam za izračun novih brzina \vec{v} potrebna ubrzanja \vec{a} u vremenu t i $t + \Delta t$. U prvom koraku, položaji u vremenu $t + \Delta t$ izračunavaju se pomoću jednadžbe (3.7) koristeći brzine i ubrzanja u vremenu t .

Kako se pretpostavlja da je sila, a time i akceleracija $\vec{a}(t)$, konstantna u danom vremenskom koraku, Δt mora biti dovoljno malen da bi to bilo ispunjeno, tj. nekoliko puta manji od perioda visokofrekventnih vibracija unutar molekule. Npr. za C-H vibracije taj period iznosi približno 10^{-14} s, pa Δt mora biti $\leq 10^{-15}$ s, tj. 1 fs. Dakle, korak u numeričkoj integraciji mora biti kraći od perioda svih gibanja koja se razmatraju, te je u simulacijama u ovom radu korišten vremenski korak jedne femtosekunde (fs). Korištenje većeg koraka doprinosi racionalizaciji računalnog vremena, a to je moguće postići fiksiranjem duljine kovalentnih veza u kojima je jedan od atoma vodik. Time se najbrža gibanja u sustavu ne mijenjaju već se zamrznu na ravnotežnu vrijednost, bez utjecaja na preostale stupnjeve slobode. Primjer takvog pristupa je dvofazni algoritam SHAKE [58] kod kojeg se vrijednost C-H veze ne mijenja tijekom simulacija što omogućava primjenu koraka od 2 fs.

Uvođenjem takvih ograničenja sustav se prisiljava na ispunjavanje danih uvjeta i u tom slučaju govorimo o tzv. *constraint* (engl.) dinamici; vezama ili kutovima je prisilno određena neka vrijednost koju moraju zadržati tijekom simulacija. Osim spomenutog, postoji i tzv. *restraint* (engl.) dinamika u kojoj veze i kutovi mogu odstupati od zadane željene vrijednosti, tj. „potiče“ ih se na određenu vrijednost, a takva ograničenja uključena su kao dodatni članovi u polje sila kojima se sprječavaju veća odstupanja od referentne vrijednosti.

SHAKE algoritam primjer je *constraint* dinamike i pomoću njega, uz današnji kapacitet računala, mogu se simulirati sustavi bioloških makromolekula i do reda veličine mikrosekunde. Budući da se radi o jako velikim sustavima, generiraju se ogromne trajektorije u kojima su zapisani položaji (i brzine) svih atoma (zapis veličine GB, pa čak i TB).

Praćenjem od okoline izoliranog sustava generira se mikrokanonski, NVE ansambl, opisan sljedećim konstantnim veličinama: brojem čestica (N), volumenom (V) i energijom (E). U njemu je očuvana ukupna (zbroy potencijalne i kinetičke) energija sustava, što odgovara adijabatskom procesu, tj. sustav je izoliran i ne izmjenjuje toplinu s okolinom. Kako to nije u skladu s realnim biološkim uvjetima, većinom se u simulacijama molekulske dinamike koriste kanonski (NVT) ili izotermno-izobarni ansambl (NPT). Temperatura i tlak su veličine koje su obično konstantne u eksperimentima stoga se upravo one uzimaju kao kontrolne varijable u simulacijama. Pored navedenih u modeliranju se ponekad koristi i generalizirani kanonski (μ VT) ansambl, prvenstveno u Monte Carlo simulacijama, a pored konstantnog volumena i temperature karakterizira ga konstantni kemijski potencijal (μ).

U kanonskom ansamblu promatrani sustav i okolina interagiraju, izmjenjujući toplinu. Okolina je puno veća od samog sustava te se njezina temperatura, kao rezultat tog međudjelovanja, zapravo ne mijenja. Konstantnost temperature tijekom simulacija postiže se korištenjem termostatskog algoritma (termostata). Tim algoritmom modificiraju se Newtonove jednačbe gibanja sa svrhom generiranja statističkog ansambla na konstantnoj temperaturi. U ovim istraživanjima korišten je Langevinov termostat. U danom termostatu svaka čestica i ponaša se kao da je uronjena u kupelj koja je sačinjena od puno manjih čestica (viskozni fluid) s kojima se sudara, čime nastaju nasumične fluktuacije atoma u proučavanom sustavu. Navedeni efekt medija opisuje se nasumičnom silom $\vec{R}(t)$ (stohastički član u jednačbi gibanja). Uslijed gibanja čestice kroz otapalo, javlja se otpornost otapala (trenje). Sila trenja, \vec{F}_{trenja} , proporcionalna je brzini čestice \vec{v} , pri čemu je konstanta proporcionalnosti koeficijent trenja ξ :

$$\vec{F}_{trenja} = -\xi\vec{v} \quad (3.9)$$

Koeficijent trenja povezan je s frekvencijom sudara čestica (γ) na sljedeći način: $\gamma = \xi / m$, gdje je m masa čestice. Znači, γ je masom skaliran koeficijent trenja.

Temperatura sustava regulira se pomoću navedena dva člana (γ i $\vec{R}(t)$), a gibanje čestice i u takvom sustavu opisuje stohastičkom diferencijalnom Langevinovom jednačbom gibanja [59]:

$$m_i \frac{d^2 \vec{x}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i \{ \vec{x}_i(t) \} - \gamma_i \frac{d\vec{x}_i(t)}{dt} m_i + \vec{R}_i(t) \quad (3.10)$$

\vec{F}_i je sila koja se javlja uslijed interakcije čestice i s drugim česticama u sustavu, te ovisi o položaju (\vec{x}_i) dane čestice u odnosu na ostale.

U računalnim simulacijama molekulske dinamike, reskaliranje brzina provodi se obično svakih nekoliko tisuća koraka.

U direktnom reskaliranju tijekom zagrijavanja sustava kontrola brzina provodi se na način da se brzina svakog pojedinog atoma pomnoži sa skalirajućim faktorom za željenu temperaturu:

$$v_n = \sqrt{\frac{T_d}{T}} v_s \quad (3.11)$$

gdje T označava trenutnu, a T_d željenu temperaturu i v_s staru, a v_n novu brzinu.

Za nasumičnu silu se pretpostavlja da nije korelirana, tj. ne ovisi o brzinama i položajima čestice, kao ni silama koje djeluju na njih, njezin vremenski prosjek jednak je nuli, a srednji kvadrat iznosi $2m_i\gamma_i k_B T$. Nekoreliranost komponenti stohastičke sile prikazana je sljedećom jednačbom:

$$\langle \vec{R}_i(t) \vec{R}_j(t + \Delta t) \rangle = 2\gamma_i m_i k_B T \delta_{i,j} \delta(\Delta t) \quad (3.12)$$

Izraz (3.12) sadrži δ -funkciju kojom je zadovoljen uvjet neovisnosti stohastičkog člana o brzinama i silama u sustavu u prethodnom vremenu simulacije. Masom skaliran faktor trenja i nasumična sila se međusobno kombiniraju za postizanje konstantnosti temperature, čime su, uz konstantni broj čestica i nepromjenjivost volumena u kojem se provode simulacije zadovoljeni uvjeti kanonskog ansambla (NVT). Realne sustave bolje opisuje izotermno-izobarni ansambl, NPT, u kojem su očuvani broj čestica (N), tlak (p) i temperatura (T). Pored termostata za konstantnost temperature, za postizanje konstantnog tlaka koristi se algoritam barostata. U ovom radu korišten je Berendsenov barostat [60], a MD simulacije provedene su pri konstantnom atmosferskom tlaku (1 atm). Tlak sustava tijekom simulacije postavlja se na željenu vrijednost promjenom veličina ćelije te reskaliranjem položaja i brzina atoma otapala.

S Berendsenovim barostatom sustav se ponaša tako da na početku svakog koraka „provjere tlaka“ zadovoljava jednadžbu:

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{P_d - P(t)}{\tau_p} \quad (3.13)$$

gdje je P_d je željena, a $P(t)$ trenutna vrijednost tlaka dok je τ_p je vremenska konstanta relaksacije tlaka. U ovom radu korišten je $\tau_p = 1$ ps .

U svakom koraku volumen ćelije skaliran je sljedećim faktorom (koordinate i vektori ćelije skalirani su s $\mu^{1/3}$):

$$\mu(t) = 1 - \frac{\Delta t}{\tau_p} \beta (P_d - P(t)) \quad (3.14)$$

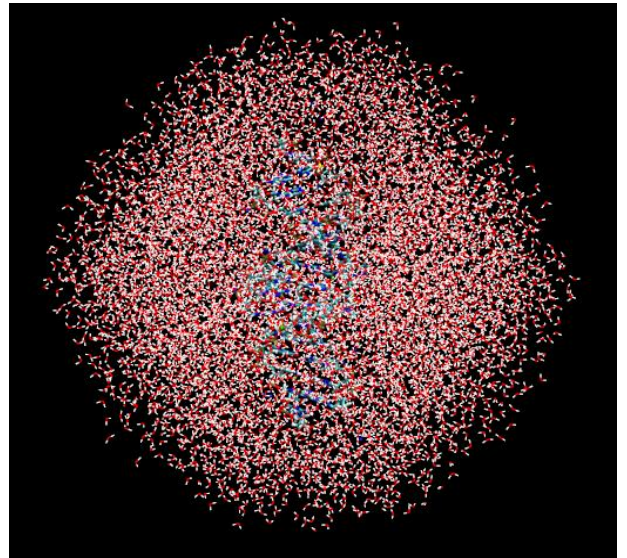
pri čemu je β je izotermna stlačivost sustava:

$$\beta = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial p} \right)_T \quad (3.15)$$

Pri tome je jednadžba gibanja atoma i na položaju \vec{r}_i :

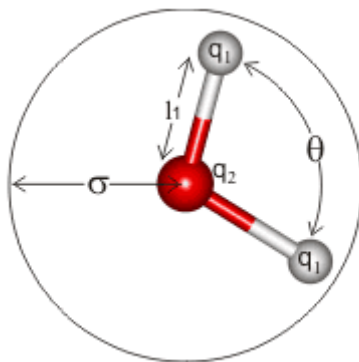
$$\frac{d\vec{r}_i}{dt} = \vec{v}_i(t) - \left(\frac{\beta (P_d - P(t))}{3\tau_p} \right) \vec{r}_i(t) \quad (3.16)$$

3D struktura molekule ili kompleksa ishodište je molekulsko dinamičkih simulacija. Ukoliko postoji eksperimentalno određena struktura, preuzimamo ju najčešće iz PDB baze (engl. *Protein Data Bank*) [61] (to su većinom strukture dobivene difrakcijom X-zraka ili NMR metodom). U protivnom, istu je potrebno generirati pomoću specijaliziranih računalnih programa. U tu svrhu, za generiranje polinukleotida, u ovom radu korišten je modul *nucgen*, unutar programskog paketa AMBER10 [49].



Slika 13. Krnji oktaedar ispunjen molekulama vode s promatranom DNA poli dAdT-poli dAdT smještenom u centru.

Da bi se dobili što realniji uvjeti za proučavanje bioloških sustava u ovom istraživanju, dani sustavi (3D strukture) su otopljeni u vodi i neutralizirani. Ti procesi provedeni su pomoću programa XLEAP u sklopu programskog paketa AMBER [49,50]. Za neutralizaciju su korišteni Na^+ ili Cl^- ioni. Otapanje u vodi provedeno je na način da je dana struktura smještena u centar krnjeg oktaedra (slika 13) ispunjenog molekulama vode, pri čemu je korišten TIP3P [62] model vode (slika 14, tablica 1).



Slika 14. TIP3P model vode (preuzeto iz [63]).

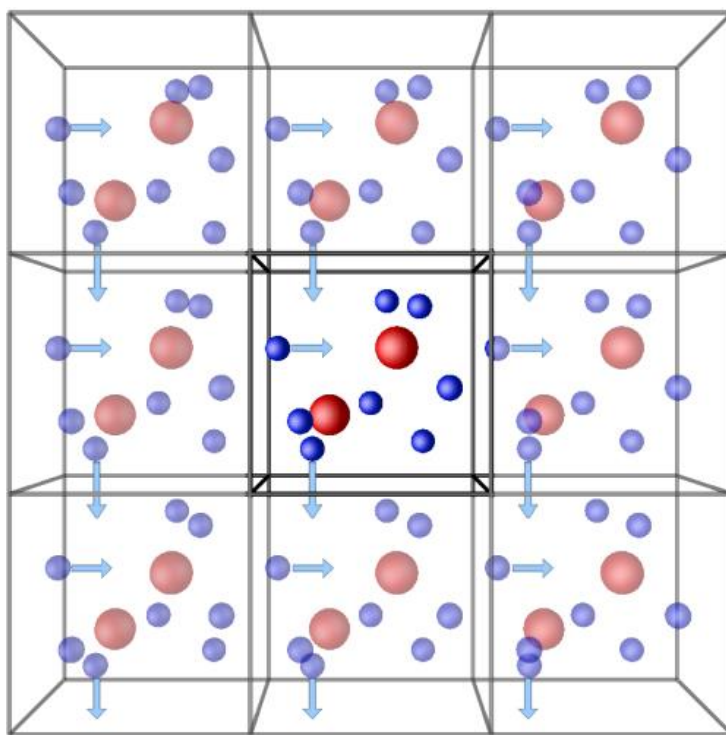
Tablica 1. Parametri kojima je opisan TIP3P model vode. σ i ε su Lennard-Jonesovi [46] parametri; σ označava van der Waalsov radijus, tj. udaljenost na koju se mogu približiti dvije ne-vezane čestice (jednaka polovici udaljenosti među jezgrama tih čestica), a ε dubinu minimuma potencijalne energije.

| model TIP3P | σ (Å) | ε (kJ mol ⁻¹) | l_1 (Å) | q_1 (e) | q_2 (e) | θ (°) |
|----------------|--------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| | 3,15061 | 0,6364 | 0,9572 | +0,4170 | -0,8340 | 104,52 |

U „realnom modelu“ potrebno je koristiti veliki broj molekula otapala. Postoji niz metoda kojima se sprječava hlapljenje molekula vode, tj. prijelaz tih molekula izvan granica „simulacijske kutije“. Jedna od najboljih metoda kojom se osigurava konstantnost molekula vode u „simulacijskoj kutiji“, a da se ne ograničava njihovo gibanje je metoda periodičnih rubnih uvjeta, PBC (engl. *Periodic Boundary Conditions*) [64]. U toj metodi „simulacijska kutija“ se replicira u sve tri dimenzije sa svrhom stvaranja periodičnog 3D sustava (slika 15). Čestica koja napusti „kutiju“ s jedne strane, ponovno ulazi sa suprotne strane kao njezina slika. Na taj način ukupan broj čestica u centralnoj, „simulacijskoj kutiji“, ostaje konstantan. U praksi se, naravno, broj replika ograničuje, kao i broj „imaginarnih atoma“ koji se direktno uključuju u račun. U tu svrhu definira se parametar dosega, tzv. „cut-off vrijednost“ (engl. *non-bonded*

cut-off distance), kojim svaki atom „vidi“ najviše jednu sliku nekog drugog atoma u sustavu. Time se uvelike smanjuje kompleksnost sustava. Tako dugo dok je veličina kutije dva puta veća od *cut-off* udaljenosti, nije moguća interakcija čestice simultano s nekom realnom česticom i njezinom slikom. Danim rubnim parametrom definirana je i udaljenosti do koje će se računati ne-vezne interakcije.

Dalekosežne elektrostatske interakcije u takvom sustavu računaju se Ewaldovom sumacijom [65] kojom se interakcijski potencijal kratkosežnih (engl. *short-range*) komponenti sumira u realnom, direktnom prostoru. Dio dalekosežnih elektrostatskih interakcija (engl. *long-range*) unutar određene „*cut-off* vrijednosti“ računa se u realnom prostoru pri čemu se koristi funkcija zasjenjenja, dok se ostale dalekosežne interakcije sumiraju u recipročnom, Fourierovom prostoru što omogućuje brzu konvergenciju računa. Jedna od najpoznatijih, i u ovom radu korištena metoda, je PME (engl. *Particle Mesh Ewald*) [66], gdje su čestice mapirane na točke rešetke.



Slika 15. PBC (preuzeto iz [67]).

3.1.4. Račun slobodnih energija

Račun slobodnih energija korišten je za izračun relativne stabilnosti različitih konformacija molekule u danom okolišu, te za usporedbu slobodnih energija vezanja liganada za isti polinukleotidni lanac. Računi su provedeni MM_PBSA (engl. *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*) metodom [68] implementiranom u program AMBER.

Promjena slobodne energije obuhvaća promjenu entalpije (ΔH) i entropije (ΔS):

$$\Delta G_{\text{vezanja}} = \Delta H - T\Delta S \quad (3.17)$$

Slobodna energija aproksimirana je sumom razlika slobodnih energija uspoređivanih sustava u vakuumu i razlika slobodnih energija otapanja.

Termodinamički ciklusi [69] koji su korišteni u tim računima prikazani su na slikama 16 i 17 i mogu se opisati jednadžbama:

$$\Delta G_{A \rightarrow B, \text{otapalo}} = \Delta G_{A \rightarrow B, \text{vakuum}} + (\Delta G_B^{\text{otapanja}} - \Delta G_A^{\text{otapanja}}) \quad (3.18)$$

$$\Delta G_{\text{vezanja, otapalo}} = \Delta G_{\text{vezanja, vakuum}} + \Delta G_{\text{kompleks}}^{\text{otapanja}} - (\Delta G_{\text{ligand}}^{\text{otapanja}} + \Delta G_{\text{receptor}}^{\text{otapanja}}) \quad (3.19)$$

MM_PBSA aproksimacija slobodne energije računa se kao suma srednjih vrijednosti potencijalne i energije otapanja (solvatacije) izračunatih za ansambl konformacija dobivenih tijekom MD simulacija. Tako je jednadžba za račun slobodnih energija vezanja u MM_PBSA aproksimaciji oblika:

$$\Delta G_{\text{MM_PBSA}} = \langle U_{\text{kompleks}} \rangle^{\text{vakuum}} - \langle U_{\text{nukle.kisel.}} \rangle^{\text{vakuum}} - \langle U_{\text{ligand}} \rangle^{\text{vakuum}} + \Delta G_{\text{solv}} \quad (3.20)$$

pri čemu je potencijalna energija sastavljena od doprinosa potencijalnih energija ne-veznih (elektrostatske, „*ele*“, i van der Waalsove interakcije, „*vdW*“) i veznih članova (engl. *bonding*, „*b*“):

$$U = U_{\text{ele}} + U_{\text{vdW}} + U_{\text{b}} \quad (3.21)$$

Razlike energija u vakuumu računate su unutar AMBER polja sila, a energije otapanja („*solv_pol*“) pomoću PBSA metode. Za izračun elektrostatske komponente energije otapanja koristi se Poisson-Boltzmannova metoda, PB, [70,71], dok se nepolarni (hidrofobni) doprinos („*solv_nepol*“) i energija potrebna za stvaranje šupljine u otapalu, u koju će se uklopiti molekula, aproksimiraju preko otapalu dostupnih površina (engl. *Solvent Accessible Surface Area*, SASA) [72].

Uvrštavanjem svih navedenih članova u izraz za promjenu slobodne energije vezanja dobivamo:

$$\Delta G_{vezanja} = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{ele} + \Delta G_{solv_pol} + \Delta G_{solv_nepol} + \Delta G_{\text{šupljine}} \quad (3.22)$$

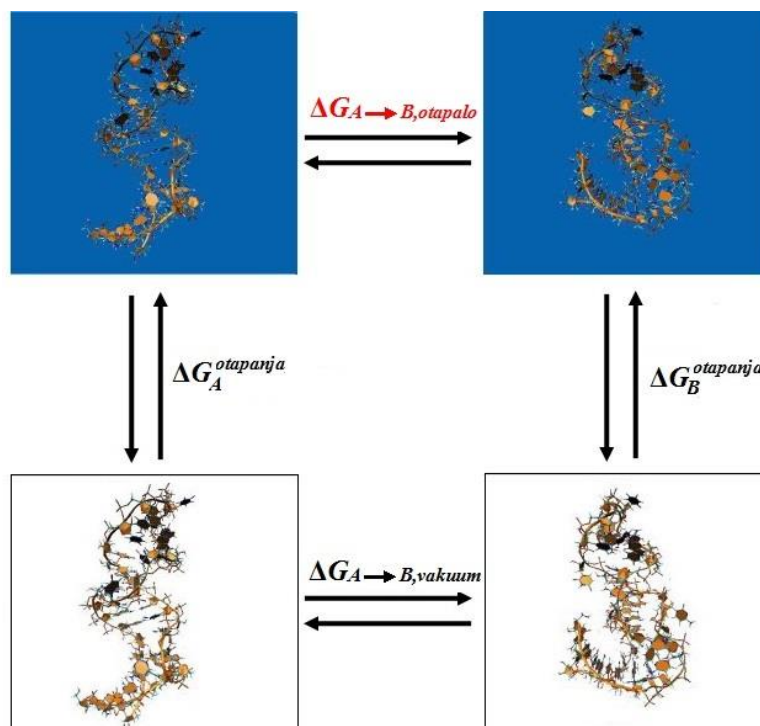
Kada bi račun provodili korištenjem eksplicitnih molekula otapala, većina energijskog doprinosa proizlazila bi iz interakcija među molekulama otapala, što bi za posljedicu imalo šum reda veličine veći od energije vezanja. Zbog toga je puno efikasnije efekte otapala na sustav uključiti korištenjem modela implicitnog otapala, pri čemu je ansambl konformera generiran tijekom MD simulacija u eksplicitnom otapalu. Za potrebe MM_PBSA računa eksplicitne molekule otapala (npr. vode i iona, ukoliko imamo ionsku otopinu) uklanjaju se iz dobivene trajektorije, a slobodna energija otapanja početnog i konačnog stanja sustava računa se na dobivenom ansamblu, kako je spomenuto, PBSA metodom.

Entropijski doprinos (3.23), točnije njegov dio koji se odnosi na konformacijsku entropiju sustava, može se odrediti analizom normalnih modova („NM“), međutim, kao što je već spomenuto, u praksi se može zanemariti ukoliko se traži samo relativna razlika energija sličnih stanja.

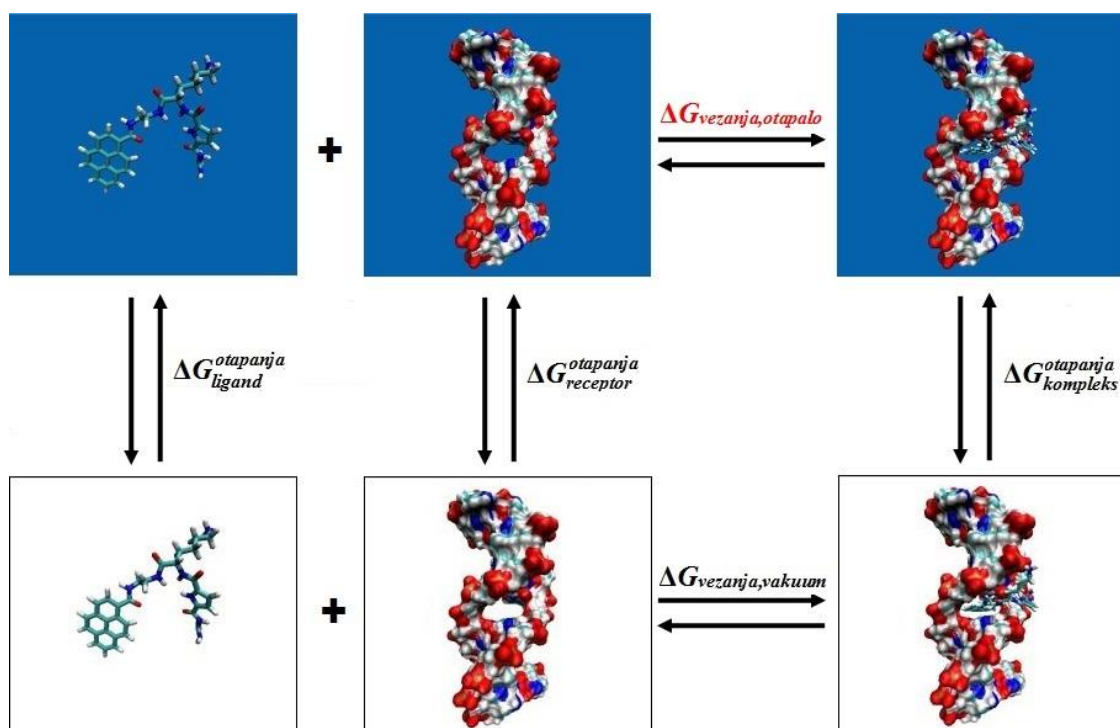
$$\Delta G_{vakuum} = \Delta E_{MM} - T\Delta S_{NM} \quad (3.23)$$

MM_PBSA modul sastavni je dio programskog paketa AMBER [49-51]. U radu će biti prikazani sljedeći doprinosi slobodnoj energiji:

- ELE = energija uslijed ne-veznih elektrostatskih interakcija
- VDW = energija uslijed ne-veznih van der Waalsovih interakcija
- PBSUR = opisuje nepolarni doprinos solvacijskoj slobodnoj energiji otapanja i slobodnu energiju potrebnu za nastanak „šupljine“ u otapalu.
- PBSOL = PBSUR + PBCAL, pri čemu je PBCAL energija reakcijskog polja, odnosno polarna komponenta energije otapanja, izračunata PB računima
- PBTOT = ukupna slobodna energija vezanja; PBTOT = PBSOL + GAS, pri čemu je GAS = ELE + VDW + INT (INT = energijski doprinos uslijed promjene veza, valentnih i torzijskih kutova).



Slika 16. Termodinamički ciklus za izračun slobodnih energija različitih konformacija molekule (HCV RNA) (plavo: u otapalu, bijelo: u vakuumu).



Slika 17. Termodinamički ciklus za izračun energije vezanja za DNA-ligand kompleks. Plavo: otopljeni sustavi, bijelo: sustavi u vakuumu.

3.2. Kvantno mehaničke metode

Kvantno mehaničke metode nazivaju se još i *ab initio* metode. Naziv *ab initio* latinskog je podrijetla i u prijevodu znači „od samog početka“. *Ab initio* metode kreću od prvih principa (postulata) kvantne mehanike te ne uzimaju u obzir eksperimentalno dobivene (empirijske) parametre, osim fundamentalnih konstanti kao što su masa elektrona, Planckova konstanta, masa elementarnih čestica i sl. Subatomske kvantno mehanički pristup koristi se za određivanje svojstava koja direktno ovise o raspodjeli elektronske gustoće ili u nekim nestandardnim sustavima za koje nisu dostupni empirijski parametri, a također i za opisivanje kemijskih reakcija u kojima dolazi do pucanja i/ili stvaranja veze. Kvantna mehanika daje nam detaljnu i točnu informaciju o nekoj molekuli (termodinamičke i strukturne vrijednosti), ali zbog svoje računalne zahtjevnosti ograničena je na male sustave.

U kvantnoj mehanici sustav je opisan valnom funkcijom koja se može odrediti rješavanjem Schrödingerove jednačbe. Njezin vremenski ovisan oblik dan je sljedećim izrazom:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V \right\} \psi(\vec{r}, t) = i\hbar \frac{\partial \psi(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (3.24)$$

i odnosi se na jednu česticu (npr. elektron) mase m koja se giba kroz prostor opisan vektorom položaja $\vec{r} = x\vec{i} + y\vec{j} + z\vec{k}$ u vremenu t , pod utjecajem vanjskog polja V (npr. elektrostatski potencijal koji djeluje na jezgru molekule). \hbar je reducirana Planckova konstanta (Planckova konstanta $h = 6,6260693 \cdot 10^{-34}$ Js; $\hbar = h / 2\pi = 1,0545717 \cdot 10^{-34}$ Js), a i je imaginarna jedinica ($i = \sqrt{-1}$). ψ je valna funkcija, kompleksan broj koji opisuje kvantno stanje promatrane čestice u vremenu i prostoru. Djelovanjem operatora na valnu funkciju mogu se odrediti observable, kao što je npr. gustoća vjerojatnosti nalaženja čestice u nekoj točki prostora u promatranom trenutku. Gustoća vjerojatnosti u slučaju valne funkcije elektrona je proporcionalna s gustoćom negativnog naboja. Ukoliko je vanjski potencijal V neovisan o vremenu, Schrödingerova jednačba zapisuje se u jednostavnijem, vremenski neovisnom obliku (kakav je korišten u ovom radu):

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V \right\} \psi(\vec{r}) = E\psi(\vec{r}) \quad (3.25)$$

gdje je E energija čestice, prvi član u zagradi $-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2$ predstavlja operator kinetičke energije, a V operator potencijalne energije. ∇^2 , Laplacian, je matematički operator dvostrukog parcijalnog deriviranja po koordinatama x , y , i z :

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (3.26)$$

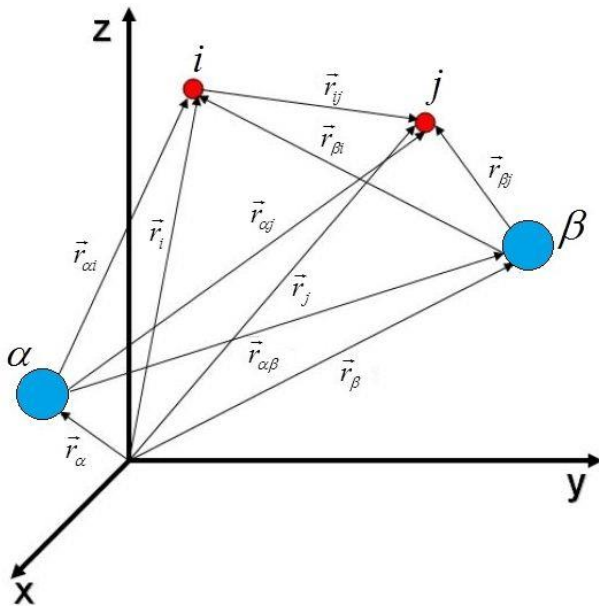
Lijeva strana jednadžbe (3.25) prikazuje se u skraćenom obliku kao $\hat{H}\psi$, gdje \hat{H} energijski operator Hamiltonijan:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V \quad (3.27)$$

čime dobivamo reducirani oblik Schrödingerove jednadžbe:

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (3.28)$$

Schrödingerova jednadžba predviđa buduće ponašanje dinamičkih sustava na subatomskej razini. To je parcijalna diferencijalna jednadžba svojstvenih vrijednosti, u kojoj operator djeluje na funkciju (svojstvena funkcija) i daje nam funkciju pomnoženu skalarom (svojstvena vrijednost). Dakle, da bi riješili Schrödingerovu jednadžbu potrebno je naći vrijednosti E i funkciju ψ , i to takve da će nam valna funkcija pod djelovanjem operatora \hat{H} dati svojstvenu vrijednost E .



$$\begin{aligned} r_{ij} &= |\vec{r}_{ij}| = |\vec{r}_i - \vec{r}_j| \\ r_{i\alpha} &= |\vec{r}_{i\alpha}| = |\vec{r}_i - \vec{r}_\alpha| \\ r_{\alpha\beta} &= |\vec{r}_{\alpha\beta}| = |\vec{r}_\alpha - \vec{r}_\beta| \end{aligned}$$

Slika 18. Primjer molekulskog koordinatnog sustava. i i j predstavljaju elektrone, a α i β jezgre.

Prilikom razmatranja sustava atomskih jezgri i elektrona (slika 18), Hamiltonijan možemo prikazati u sljedećem obliku:

$$\begin{aligned}\hat{H} = & -\sum_i \frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2 - \sum_\alpha \frac{\hbar^2}{2m_\alpha} \nabla_\alpha^2 - \sum_i \sum_\alpha \frac{Z_\alpha e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_i - \vec{r}_\alpha|} \\ & + \frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_i - \vec{r}_j|} + \frac{1}{2} \sum_\alpha \sum_{\beta \neq \alpha} \frac{Z_\alpha Z_\beta}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_\alpha - \vec{r}_\beta|}\end{aligned}\quad (3.29)$$

gdje su \vec{r}_i i \vec{r}_j položaji elektrona, \vec{r}_α i \vec{r}_β položaji jezgri, Z_α i Z_β njihovi atomski brojevi, m_e masa elektrona ($m_e = 9,1094 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$), m_α masa jezgre, a e elektronski naboj, $e = 1,6022 \cdot 10^{-19} \text{ C}$. Prva dva člana s desne strane predstavljaju operatore kinetičke energije elektrona odnosno jezgri. Narednim članovima opisane su elektrostatske energije elektron-jezgra, elektron-elektron i jezgra-jezgra međudjelovanja.

Schrödingerova jednadžba nema egzaktno rješenje za sustav koji sadrži više od jednog elektrona, te je potrebno uvesti neke aproksimacije. Pri proučavanju molekulskih sustava najčešće se koristi Born-Oppenheimerova (BO) aproksimacija [73] kojom se gibanje elektrona može promatrati neovisno o gibanju jezgri zbog velike razlike u njihovim masama (masa elektrona približno iznosi 1/1836 mase protona). Sile koje djeluju na elektrone i jezgre, uslijed njihovog naboja, istog su reda veličine. Prema tome, promjene koje se javljaju u njihovim količinama gibanja (momentima), kao rezultat djelovanja tih sila, također su jednake. Pošto su jezgre puno masivnije od elektrona, njihove brzine su puno manje. Upravo zbog toga, u rješavanju Schrödingerove jednadžbe, prema Born-Oppenheimerovoj aproksimaciji, razmatra se elektronsko gibanje dok se jezgre tretiraju kao stacionarne. Ukupna valna funkcija molekule prikazuje se kao produkt elektronske i nuklearne valne funkcije:

$$\psi_{ukupna}(\text{jezgra}, \text{elektroni}) = \psi(\text{elektroni})\psi(\text{jezgra}) \quad (3.30)$$

U toj je aproksimaciji, Hamiltonijan koji djeluje na valnu funkciju elektrona, čiji su vektori položaja \vec{r}_i , u prisustvu stacionarnih jezgri, \vec{r}_α , dan sljedećim izrazom:

$$\hat{H} = -\sum_i \frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2 - \sum_i \sum_\alpha \frac{Z_\alpha e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_i - \vec{r}_\alpha|} + \frac{1}{2} \sum_i \sum_{i \neq j} \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \quad (3.31)$$

3.2.1. Hartree-Fock *ab initio* metoda

Postoji više kvantnih teorija za tretiranje molekulskog sustava. Jedna od najpoznatijih je *ab initio* Hartree-Fock (HF) metoda [52]. Razvijena je na temelju teorije molekulskih orbitala (MO). \hat{H} ne ovisi eksplicitno o vremenu (proučava se samo valna funkcija stacionarnih stanja), zanemaruju se relativistički efekti, a elektronske valne funkcije odvajaju se od nuklearnih i zanemaruje se gibanje jezgri (BO aproksimacija). Hartree-Fock metodom određuju se valna funkcija i energija višeelektronskog sustava u ravnotežnom stanju. Točnije, smatra se da elektroni međusobno ne interagiraju već se promatraju u srednjem polju koje je rezultat djelovanja svih ostalih elektrona u sustavu (tj. zauzimaju jednočestične orbitale) tvoreći time valnu funkciju, čime je zapravo višeelektronski problem sveden na niz jednoelektronskih. HF metodom aproksimira se valna funkcija kao skup jednoelektronskih funkcija (orbitala), pri čemu je svaka produkt prostorne funkcije i spinskog stanja. Za određeni broj elektrona (N) takve antisimetrične valne funkcije (uključeni samo oni spinovi koji uzrokuju antisimetričnost) prikazuju se kao Slaterova determinanta spin orbitala (3.34).

$$\psi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \psi_1(\vec{r}_1) & \psi_2(\vec{r}_1) & \cdots & \psi_N(\vec{r}_1) \\ \psi_1(\vec{r}_2) & \psi_2(\vec{r}_2) & \cdots & \psi_N(\vec{r}_2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \psi_1(\vec{r}_N) & \psi_2(\vec{r}_N) & \cdots & \psi_N(\vec{r}_N) \end{vmatrix} \quad (3.32)$$

Skup HF orbitala je ortonormiran (bilo koje dvije spinske orbitale su ortogonalne ako imaju suprotne spinove, a ako imaju isti spin, tada njihove prostorne orbitale moraju biti ortogonalne). Orbitale $\psi_i(\vec{r}_i)$ dobivaju se minimizacijom u okviru varijacijskog teorema te se u tu svrhu izračunava očekivana vrijednost Hamiltonijana te varijacijske valne funkcije:

$$E_H = \langle \psi | \hat{H} | \psi \rangle \quad (3.33)$$

Rješenje Schrödingerove jednadžbe (jednadžbe vlastitih vrijednosti) u HF aproksimaciji ovisi o odabiru valne funkcije. U tom odabiru pomaže nam *varijacijski teorem*. Prema tom teoremu će energija dobivena na temelju aproksimativne valne funkcije uvijek biti viša od stvarne energije, tj. što je bolja valna funkcija, niža je energija. Odnosno, za dani raspored jezgri traži se elektronska valna funkcija za koju će energija biti najniža. HF metoda naziva se još i metoda samodosljednog polja (engl. *self-consistent field method* – *SCF*) jer se u aproksimativnom rješavanju Schrödingerove jednadžbe HF metodom koristi pristup samodosljednosti polja prema kojem rješenje svakog narednog koraka proizlazi iz prethodnog. Rješavanjem jednadžbe za jedan elektron utječe se na rješenja drugih elektrona u sustavu. U

početku se definira skup probnih rješenja za HF jednadžbe vlastitih vrijednosti koje se koriste za izračun Coulombovih i promjenjivih operatora. Dobivena rješenja koriste se u sljedećoj iteraciji. SCF metodom se usavršavaju pojedina elektronska rješenja koja odgovaraju sve nižim i nižim energijama do točke u kojoj je postignuta nepromjenjivost rezultata za sve elektrone, tj. njihova samodosljednost.

3.2.2. Metoda funkcionala gustoće

Pored Hartree-Fock metode, u ovom radu korištena je i teorija funkcionala gustoće DFT (engl. *Density Functional Theory*) [74]. Za razliku od valne funkcije, koja nije fizička observabla već matematička konstrukcija, elektronska gustoća je fizičko svojstvo svih molekula. Hohenberg i Kohn su 1964. godine [75] pokazali da su u osnovnom energijskom stanju svojstva sustava jedinstveno definirana elektronskom gustoćom. DFT metodom dimenzionalnost problema se smanjuje budući da se ne razmatraju valne funkcije, već gustoća vjerojatnosti (naboja) koja je njima određena.

Naime, dok se HF pristupom, za sustav koji se sastoji od N elektrona, ukupna valna funkcija izračunava na temelju N jednoelektronskih valnih funkcija, DFT metodom opisuju se svojstva molekule na temelju prostorno ovisne elektronske gustoće, $\rho(x, y, z)$ i ne vodi se računa o broju elektrona. Na taj se način potrebno računalno vrijeme bitno smanjuje što je jedna od najznačajnijih prednosti DFT metode. Glavni cilj DFT metode je pronaći funkcional F koji djelovanjem na elektronsku gustoću daje energiju molekule:

$$\text{Energija} = F[\rho(x, y, z)] \quad (3.34)$$

Zbog velikog broja različitih aproksimacija funkcionala F postoji mnogo različitih DFT metoda. Kohn i Sham su 1965. godine iznijeli teoriju prema kojoj se ukupna molekulska energija može prikazati kao suma različitih članova ovisnih o elektronskoj gustoći:

$$E_{DFT}[\rho] = E_k[\rho] + E_{ne}[\rho] + E_{ee}[\rho] + E_{xe}[\rho] \quad (3.35)$$

gdje je E_{DFT} ukupna energija molekule, E_k kinetička energija elektrona, E_{ne} energija privlačenja jezgre i elektrona (Coulombova energija), E_{ee} energija elektron-elektron odbijanja (Coulombova energija) i E_{xe} energija elektron-elektron promjene korelacije koja se odnosi na to kako elektron interagira, ili kako „vidi“ drugi elektron.

DFT metoda može biti primijenjena na većinu sustava. Postoje tri kategorije DFT metoda: metode aproksimacije lokalne gustoće LDA (engl. *Local density approximation*)

pretpostavljaju da je gustoća jednolika duž cijele molekule; metode gradijentnih popravki GC (engl. *Gradient-corrected*) uključuju i neuniformnost elektronske gustoće; i hibridne metode koje nastoje objediniti neke značajke *ab initio* metoda (posebno HF metode) s DFT matematičkim pristupom. Hibridne metode, kao što je npr. B3LYP, najčešće se koriste.

Za provedbu kvantno mehaničkih računa koriste se određeni bazni skupovi kojima su opisane molekulske orbitale. To su linearne kombinacije skupa temeljnih funkcija tj. atomskih orbitala (rješenja Hartree-Fock jednadžbi) centriranih na svaku atomsku jezgru unutar molekule (engl. *Linear combination of atomic orbitals*, LCAO). Atomske orbitale dobro su opisane Slaterovim tipom orbitala, STO (engl. *Slater-type orbitals*) [76] koje se radi pojednostavljenja numeričkog računa aproksimiraju funkcijama Gaussovog tipa. Tako je npr. u minimalnom baznom skupu, STO-3G, svaka Slaterova orbitala aproksimirana s tri Gaussove funkcije. Postoji niz baznih skupova zasnovanih na Gaussovom tipu orbitala, GTO (engl. *Gaussian-type orbitals*) [77]. Minimalni bazni skup definira se kao onaj u kome je za svaki atom u molekuli korištena po jedna bazna funkcija po orbitali. Najčešći bazni skupovi su STO-*n*G gdje *n* označava broj Gaussovih funkcija koji se koristi za opis jedne bazne funkcije, pri čemu je on isti za unutarnje i valentne orbitale. U svrhu poboljšanja računa koriste se Pepleovi bazni skupovi [78] koji se prikazuju kao X-YZG, pri čemu je X broj baznih funkcija za unutarnje (engl. *core*) orbitale, dok se Y i Z odnose na bazne funkcije valentnih orbitala. Npr. u baznom skupu 3-21G za opis unutarnjih orbitala koriste se tri jednako usmjerene Gaussove funkcije dok se valentne orbitale opisuju s dva člana duž osi x i jednim duž y-osi. Takav zapis u kojem imamo dva broja iza crtice predstavlja bazni skup *split-valance double-zeta*. Postoje još i *split-valence triple-* i *quadrupole-zeta* bazni skupovi koje se prikazuju u obliku X-YZWG, odnosno X-YZWVG. Ovisno o promatranom sustavu, Pepleovi bazni skupovi proširuju se polarizacijskim i/ili difuznim funkcijama. Polarizacijske funkcije predočene su znakom *, npr. 3-21G*, dok se ** odnose na polarizacijske funkcije pridružene laganim atomima (vodik i helij). Još preciznija notacija je (d, p) kojom se definira koje će i koliko funkcija biti pridruženo baznom skupu. Difuzne funkcije prikazane su znakom +, npr. 3-21+G. U slučaju baznog skupa 3-21+G* uključene su polarizacijske i difuzne funkcije.

Ovisno o problemu, QM računi mogu se provoditi u plinskoj fazi (bez otapala) ili uz simulaciju otapala, odnosno nekog drugog okoliša. S obzirom na računalnu zahtjevnost kvantno mehaničkih računa, koristi se kontinuirana aproksimacija okoliša što znači da se on (najčešće je to voda) tretira kao uniformi polarizabilni medij određene dielektrične konstante, tj. kontinuirano otapalo opisano je u terminima makroskopskih svojstava. Modeliranje otapala kao

polarizabilnog kontinuuma uvelike utječe na smanjenje računalnog vremena potrebnog za provođenje *ab initio* računa. Najpoznatija metoda za modeliranje efekata otapala u QM pristupu je model polarizabilnog kontinuuma, PCM (engl. *Polarizable continuum model*) [79]. Postoje dva tipa PCM modela: dielektrični, D-PCM (engl. *Dielectric PCM*) i provodni C-PCM (engl. *Conductor-like*) model. D-PCM tretira kontinuirano otapalo kao polarizirani dielektrik, a C-PCM kao sredstvo konstantne permitivnosti.

3.2.3. Semiempirijske metode

Semiempirijske, kao i *ab initio* metode, počivaju na kvantno mehaničkim principima, tj. Hartree-Fock [52] formalizmu. I jednim i drugim metodama rješava se Schrödingerova jednačina [80] za elektronsku valnu funkciju, u okviru Born-Oppenheimerove aproksimacije [73]. Međutim, semiempirijske metode znatno su pojednostavljene na način da uključuju mnoge aproksimacije i eksperimentalno dobivene (empirijske) parametre. Bazni skup ograničen je na valentne orbitale i račun elektronskih integrala znatno je pojednostavljen zanemarivanjem ili parametarskom procjenom određenih doprinosa. Takve metode pogodne su za tretiranje velikih molekulskih sustava u kojima su kvantno mehaničke metode neučinkovite jer su računski prezahtjevne. Tako je npr. novijim semiempirijskim metodama omogućeno proučavanje molekulskih sustava koji se sastoje od nekoliko tisuća atoma dok se *ab initio* pristupom za rješavanje istog problema može tretirati oko pedeset do sedamdeset atoma. Semiempirijske metode mogu se koristiti i za početnu procjenu geometrije molekule na koju se zatim naknadno primjenjuje *ab initio* postupak. Takav primjer je upotreba semiempirijske PM6 (engl. *Parametric Method 6*) [81] metode u ovom radu, unutar programa GAUSSIAN 09 [82] i MOPAC [83].

Osim navedene, u računima se često koriste sljedeće semiempirijske metode: MNDO (engl. *Modified Neglect of Diatomic Overlap*) [84], AM1 (engl. *Austin Model 1*) [58] i PM3 (engl. *Parametric Method 3*) [85]. Dane metode zasnivaju se na modificiranom pristupu u kojem se zanemaruje dvoatomska diferencijalno prekrivanje NDDO (engl. *Neglect of Diatomic Differential Overlap*) [86].

Semiempirijske metode mogu se koristiti i za određivanje prijelaznih stanja, raspodjele naboja, topline stvaranja te energije molekulskih orbitala, a također i za razvoj i testiranje novih metodologija i algoritama kao što je npr. kombinirana kvantno mehanička - molekulsko mehanička metoda modeliranja biokemijskih procesa. Točnost metode uvelike ovisi o sustavu

koji se proučava. Prilikom odabira metode, potrebno je imati na umu njezina ograničenja. Za proučavanje velikih sustava, za optimizaciju i izračun konformacijskih energija, učinkovite su i metoda molekulske mehanike i semiempirijska kvantna mehanika. Pristup molekulskom mehanikom je manje zahtjevan i puno brži. Međutim, ukoliko ne postoji odgovarajuće polje sila (npr. za neka prijelazna stanja), semiempirijske metode mogu biti jedini izbor. U slučaju malih sustava, najpouzdaniji su, ali i vremenski najzahtjevniji, *ab initio* računi. U globalu, semiempirijski rezultati pružaju najveću točnost ukoliko se radi o sustavima sličnim onim molekulama za koje je određen korišteni skup parametara.

3.3. Kvantno mehaničke – molekulske mehaničke metode

Pored navedenih, kvantno mehaničkih metoda, postoje i kombinirane kvantno mehaničke – molekulske mehaničke metode (QM/MM, engl. *Quantum Mechanics – Molecular Mechanics*) [87]. Kombinirane QM/MM metode (slika 19) koriste se u analizi složenijih molekulskih sustava gdje se manji dio tretira kvantno mehanički kako bi se opisala neka kemijska reakcija ili drugi procesi gdje dolazi do preraspodjele naboja, elektronskog pobuđenja itd. (npr. to može biti ligand za koji želimo ispitati ovisnost raspodjele naboja o okolini). Kvantno mehanički se mogu tretirati sustavi od maksimalno nekoliko stotina atoma. S obzirom na veličinu i konformacijsku kompleksnost bioloških makromolekula (neke sadrže i preko nekoliko stotina tisuća atoma), veći dio takvog sustava (receptor i okolina) potrebno je tretirati molekulskom mehanikom zasnovanom na polju sila. Ukupna energija takvog sustava može se prikazati kao:

$$E_{TOT} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM} \quad (3.36)$$

gdje je E_{QM} energija onog dijela sustava koji se tretira kvantno mehanički, E_{MM} energija molekulske mehaničke dijela, a $E_{QM/MM}$ energija interakcije između kvantno mehaničkog i molekulske mehaničkog dijela sustava i opisuje se Hamiltonijanom.

U ovom radu korištena je subtraktivna, dvoslojna ONIOM (engl. *Our own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics*) [88] QM/MM metoda, unutar programa GAUSSIAN [82]. Veći, vanjski dio sustava (*r-m*, tzv. „MM“ sloj) opisan je isključivo poljem sila (AMBER ff99 [89]). Ukupna energija sustava izračunava se na sljedeći način:

$$E^{ONIOM} = E^{r,MM} + E^{m,QM} - E^{m,MM} \quad (3.37)$$

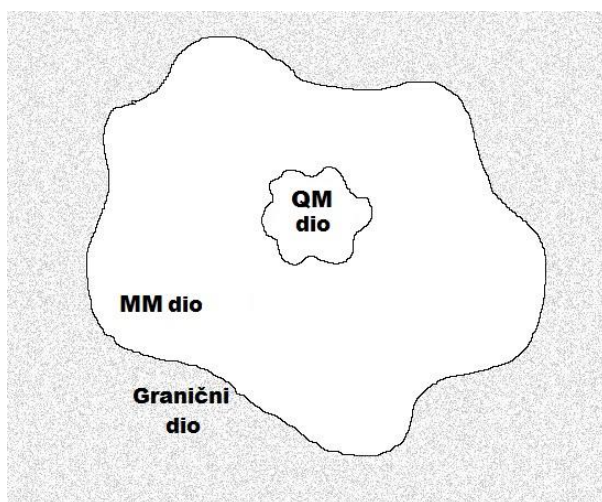
gdje je $E^{r,MM}$ ukupna energija cjelokupnog sustava izračunata MM pristupom, $E^{m,QM}$ energija modelnog (m ili tzv. „QM“ dijela) sustava, a $E^{n,MM}$ energija modelnog sustava izračunata MM metodom.

Elektrostatske interakcije između „QM“ i „MM“ slojeva u ONIOM metodi mogu se računati na dva načina. Prvi je klasično, mehaničko uklapanje (engl. *Mechanical Embedding*, ME), a drugi elektrostatsko uklapanje (engl. *Electrical Embedding*, EE). U ME pristupu QM dijelu nameću se isključivo steričke interakcije od strane preostalog („vanjskog“, „MM“) dijela sustava, dok se elektrostatske interakcije između slojeva „QM“ i „MM“, računaju empirijski, MM metodom. U EE pristupu parcijalni naboji iz „MM“ sloja ugrađuju se u kvantno mehanički Hamiltonijan. EE daje bolji opis elektrostatskih interakcija između „QM“ i „MM“ slojeva jer omogućuje polarizaciju „QM“ dijela u ovisnosti o raspodjeli naboja u „MM“ sloju. U EE ONIOM računu, drugi i treći član s desne strane jednadžbe 3.37 izračunavaju se na sljedeći način:

$$E_v^{m,QM} = E^{r,MM} - \sum_i \sum_N \frac{s_N q_N}{r_{iN}} + \sum_J \sum_N \frac{Z_J s_N q_N}{r_N} \quad (3.38)$$

$$E_v^{m,MM} = E^{m,MM} + \sum_J \sum_N \frac{q_J s_N q_N}{r_N} \quad (3.39)$$

gdje su N atomi iz MM, a J iz QM dijela, dok se i odnosi na elektrone. $E^{r,MM}$ i $E^{m,MM}$ predstavljaju energije dobivene ME uklapanjem. Skalirajući faktor s_N koristi se za izbjegavanje prekomjerne polarizacije valne funkcije uslijed velikih naboja u blizini QM područja (obično je s_N nula za naboje koji su udaljeni tri i više kovalentnih veza od QM dijela).



Slika 19. Shematski prikaz tretiranja sustava QM/MM metodom (preuzeto iz [90] i prerađeno).

Kvantno mehanički račun u ovom radu korišten je u svrhu parametrizacije, točnije, za određivanje parcijalnih atomskih naboja u slučaju dvostruke protonirane uzvojnice RNA poli rAH⁺-poli rAH⁺ (HF/6-31*). QM/MM pristup korišten je za određivanje raspodjele elektronske gustoće unutar molekule u različitim okolišima te za izračun energije vezanja.

Ab initio računi u ovom radu provedeni su u programu GAUSSIAN [82].

3.4. Programi korišteni za analizu i vizualizaciju sustava

InsightII

InsightII [91] je program za molekulsko modeliranje bioloških sustava (uključujući i one koji sadrže metale), prilagođen korisniku, razvijen od strane *Accelrys Inc.* Program je prilagođen *Silicon Graphics* i *Linux* radnim stanicama. Sadrži niz modula od kojih su u ovom radu korišteni: *Builder*, *Biopolymer* (oba služe za gradnju molekula) i *Modify Torsion*.

VMD

VMD (engl. *Visual Molecular Dynamics*) [92] je sofisticirani program za vizualizaciju molekula i analizu geometrije. Osim za prikazivanje statičkih struktura, koristi se i za praćenje gibanja molekula učitavanjem molekulsko dinamičkih trajektorija. Prepoznaje većinu formata u kojem su zapisane molekulske koordinate te posjeduje veliki broj različitih opcija i načina prikazivanja molekula.

PTRAJ i CPPTRAJ

PTRAJ i njegov nasljednik, CPPTRAJ, [93] dostupni unutar AMBERTools paketa, su računalni programi za analizu i procesiranje trajektorija dobivenih simulacijama unutar programskog paketa AMBER (u ovom radu korišteni su AMBER9 [94], AMBER10 [49], AMBER11 [50] i AMBER12 [51]). Omogućuju konvertiranje trajektorijskih formata, procesiranje generiranih grupa trajektorija, kreiranje srednjih struktura, odvajanje određenih podjedinica iz sustava, praćenje pojedinih geometrijskih parametara (udaljenosti, kutova) među atomima u sustavu, izračun srednjeg kvadratnog pomaka atoma, radijusa giracije i sl. Za trajektorije generirane korištenjem PBC vrše korekciju difuzije atoma.

4. REZULTATI I RASPRAVA

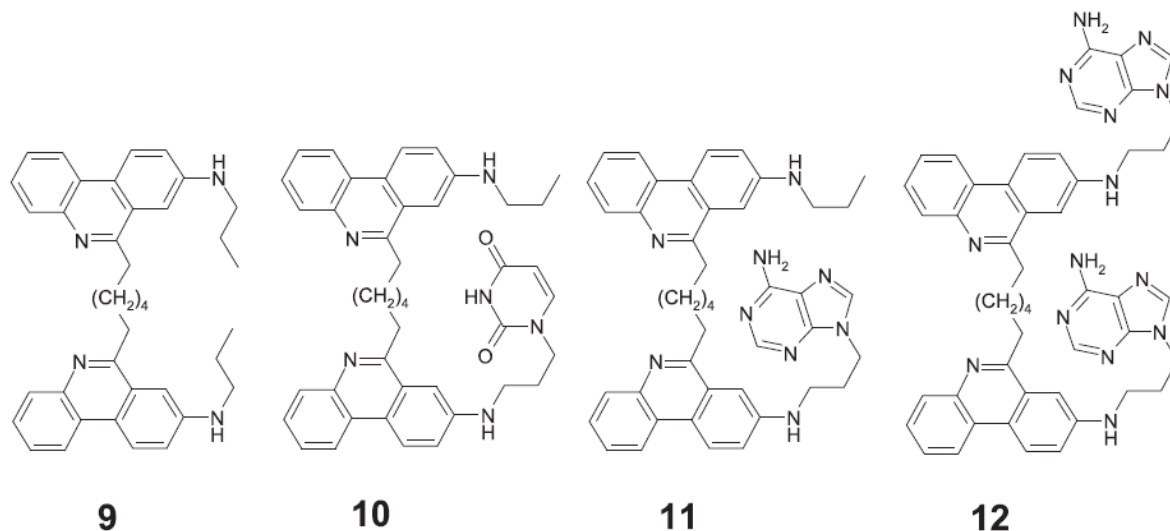
4.1. Metode molekulskog modeliranja

Kao predložak za modeliranje bisfenantridinskih, guanidiniokarbonil-pirol-arilnih i cijaninskih spojeva te njihovih kompleksa korišteni su rezultati spektroskopskih mjerenja (UV-Vis i CD spektri, fluorimetrijske titracije) [12-14,95-99], a za komplekse RNA IRES subdomene IIa s translacijskim inhibitorima HCV-a rezultati difrakcijske i NMR analize [30,36,37]. Za modeliranje kompleksa IIa s benzimidazolnim inhibitorima bile su poznate eksperimentalno određene 3D strukture. U ostalim slučajevima, ligandi i kompleksi izgrađeni su pomoću programa InsightII [91], koristeći modul *Builder*, dok je za gradnju samih polinukleotida korišten program *nucgen* unutar programskog paketa AMBER10 [49]. Za parametrizaciju sustava korištena su AMBER polja sila (GAFF [48], ff03 [5], ff99 [89] i ff99SB [5]). U svrhu određivanja parametara za ds-RNA poli rAH⁺-poli rAH⁺, te za određivanje parcijalnih atomskih naboja na translacijskim inhibitorima HCV-a provedi su QM računi.

Dobivene molekule, odnosno njihovi kompleksi, smješteni su u centar krnjeg oktaedra ispunjenog molekulama vode (model TIP3P [62]), pri čemu je sloj molekula vode sezao minimalno do udaljenosti 7 Å (za sustave bisfenantridinskih i cijaninskih spojeva u kompleksima s polinukleotidima) ili 8 Å (za sustave bisfenantridinskih derivata modeliranih s nukleotidima, guanidiniokarbonil-pirol-arilnih konjugata u kompleksima s ds-DNA i za sustave s translacijskim inhibitorima HCV-a) od površine danih molekulskih sustava. Ovisno o nabijenosti, za neutralizaciju pojedinih sustava korišteni su Cl⁻, Na⁺ ili Mg²⁺ ioni. Optimizacija geometrije i molekulsko dinamičke simulacije provedene su unutar programa AMBER. Simulacije su provedene korištenjem periodičnih rubnih uvjeta (PBC), a elektrostatske interakcije računate su PME metodom uz parametar dosega od 11 Å. Sustavi su najprije optimizirani koristeći metode najstrmijeg spusta i konjugiranih gradijenata (1500 koraka za svaku metodu u slučaju sustava bisfenantridinskih spojeva modeliranih s nukleotidima, a 2500 koraka za svaku metodu za sve ostale sustave). Nakon minimizacije energije, svaki sustav je zagrijavan, pri čemu je temperatura linearno povećana od 0 K do 300 K. Nakon uravnoteženja sustavi su simulirani korištenjem NPT uvjeta (300 K, 1 atm). Vremenski korak tijekom simulacija bio je 1 fs, a temperatura je održavana konstantnom koristeći Langevinovu dinamiku s frekvencijom sudara 1 ps⁻¹.

4.2. Interakcije konjugata bisfenantridin-nukleobaza s nukleotidima

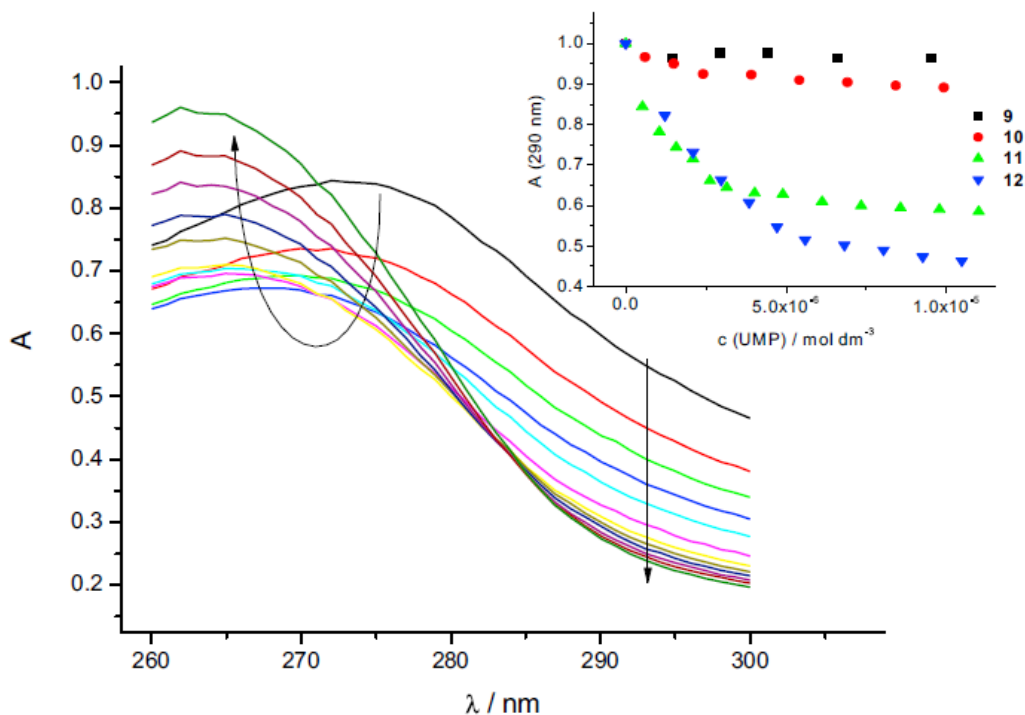
Molekulsko modeliranje provedeno je za novosintetizirane i u vodi topljive bisfenantridinske spojeve: referentni derivat bisfenantridina **9**, konjugat bisfenantridina i nukleobaze uracila **10**, odnosno adenina **11** i **12** (slika 20), te za njihove interakcije s komplementarnim nukleotidima (adenozin-monofosfat AMP i uridin-monofosfat UMP).



Slika 20. Bisfenantridinski spojevi (preuzeto iz [95]).

Sami spojevi, kao i njihove interakcije s nukleotidima u vodenom okruženju, eksperimentalno su proučeni metodama UV-Vis spektroskopije i fluorimetrijske titracije [95]. Mjerenja su provedena na pH=5,0, što podrazumijeva protoniranost dušika iz fenantridinskog prstena. Na temelju izraženog hipokromnog efekta apsorpcijskog maksimuma spojeva (u odnosu na referentni monomer Phen-**C3**), pretpostavljeno je da dolazi do intramolekulskog paralelnog slaganja (engl. „*stacking*“) aromatskih jedinica. Slaba fluorescencija referentnog spoja **9** pripisana je snažnom intramolekulskom sljepljivanju fenantridinskih podjedinica, dok je za konjugate **10-12**, koji su pokazali jaku fluorescenciju, pretpostavljeno da dolazi do, barem djelomičnog, umetanja nukleobaze između fenantridina. UV-Vis spektar razmatran je za valne duljine od 260 do 300 nm, gdje i spojevi (**9-12**) i nukleotidi apsorbiraju svjetlo. Kako bi se pratila interakcija konjugata fenantridina s nukleobazama AMP i UMP, korištene su valne duljine veće od 290 nm. Titracije adeninskih konjugata **11** i **12** s UMP-om rezultirale su jakim hipokromnim efektom u odnosu na referentni spoj **9** i konjugat uracila **10** (slika 21). Navedeni rezultati ukazivali su na učinkovitije preklapanje aromatskih površina u slučaju kompleksa **11**-UMP i **12**-UMP te oblikovanje adenin-UMP para baza u području između fenantridinskih podjedinica. Također, za danu valnu duljinu, titracije spojeva **11** i **12** s AMP-om rezultirale su

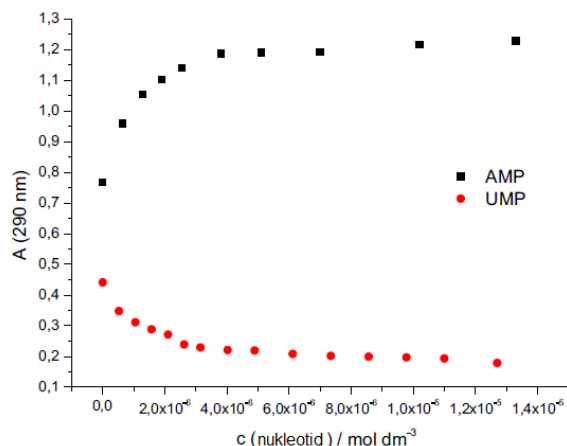
hiperkromnim efektom u UV-Vis spektru (slika 22) što se povezuje sa smanjenim stupnjem orijentacije kovalentno vezanog adenina između fenantridinskih jedinica u danim spojevima te je stvaranje para baza s AMP-om teško zamislivo. Nadalje, površina takvog para adenin-adenin premašila bi površinu fenantridina te ne bi moglo doći do učinkovitog preklapanja aromatskih površina u usporedbi s parom uracil-adenin, na temelju čega je pretpostavljeno da će se AMP i kovalentno vezani adenin nadmetati za vezno mjesto unutar spojeva **11** i **12**, što u konačnici rezultira opaženim hiperkromnim efektom.



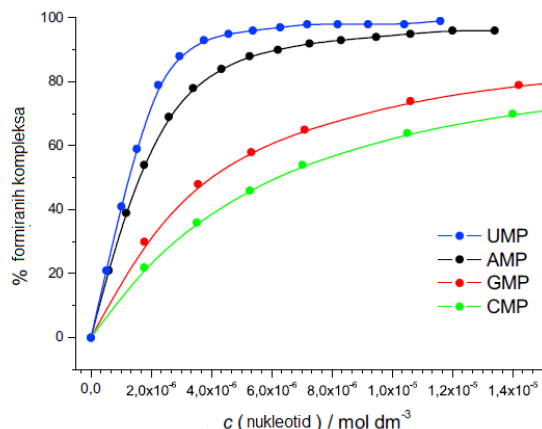
Slika 21. UV-Vis titracije spoja **12** s UMP; za valne duljine > 285 nm opažen je isključivo pad absorbancije pošto dani spoj, ali ne i UMP, absorbira svjetlo, dok se kod maksimuma (273 nm) opža prvo pad absorbancije, a zatim porast s pomakom maksimuma kompleksa na 263 nm. Umetnuti graf: promjene u UV-Vis spektru ($\lambda \geq 290$ nm) spojeva **9-12** tijekom titracija s UMP (preuzeto iz [95]).

Adeninski konjugat **11** pokazao je najveći afinitet vezanja prema komplementarnom UMP-u u odnosu na druge nukleotide (slika 23). Također, za dani spoj dobivena je najveća (veća za red veličine) konstanta vezanja za UMP ($\log K_s = 6,9$), u odnosu na ostale nukleotide [95].

Na temelju eksperimentalnih rezultata, pretpostavljene konformacije proučene su molekulskim modeliranjem.



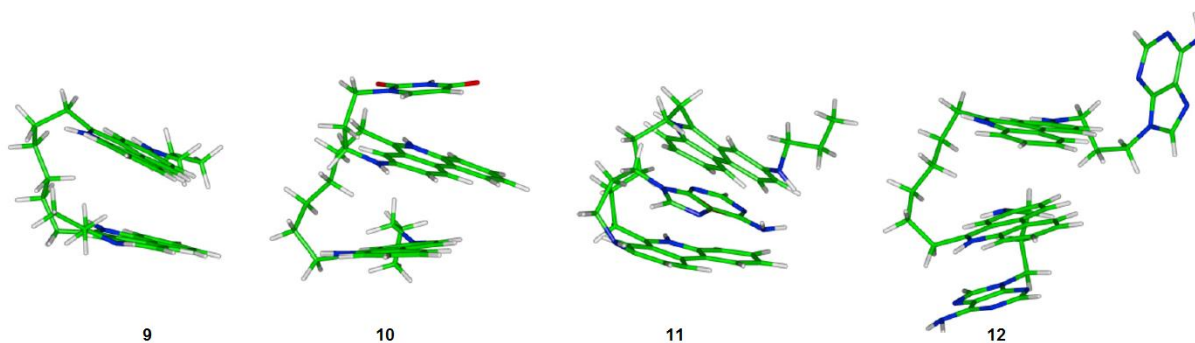
Slika 22. Promjene u UV-Vis spektru ($\lambda \geq 290\text{ nm}$) spoja **11** uslijed titracija s UMP-om i AMP-om (preuzeto iz [95] i prerađeno).



Slika 23. Postotak nastalih kompleksa spoja **11** s nukleotidima (preuzeto iz [95] i prerađeno).

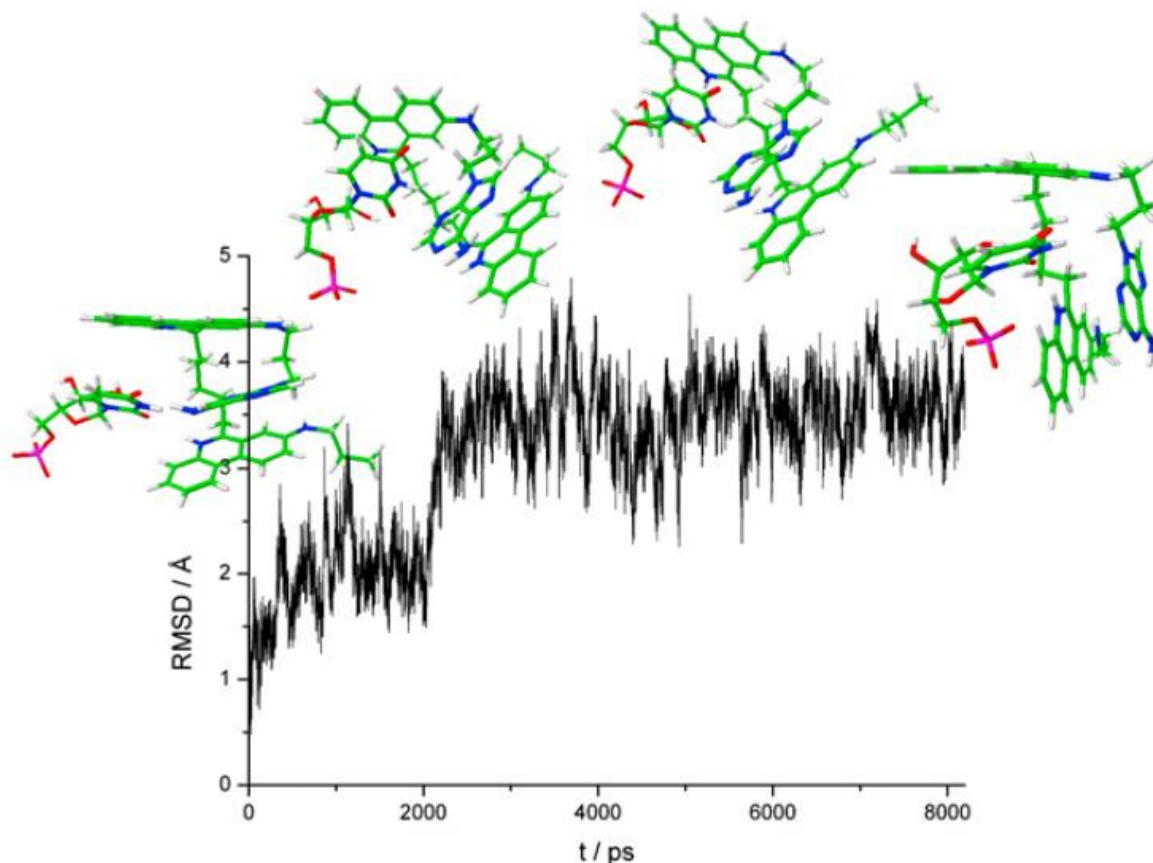
4.2.1. MD simulacije

Dani spojevi izgrađeni su u obliku paralelno položenih fenantridinskih jedinica i kovalentno vezanih nukleobaza. Struktura AMP-a preuzeta je iz PDB baze, kod 1Z6S. UMP je sagrađen iz strukture AMP-a, zamjenom adenina s uracilom. Parametrizacija je provedena korištenjem AMBER polja sila ff03 [5] i GAFF [48]. Sustavi su otopljeni, neutralizirani (Cl^- ioni), optimizirani i simulirani na isti način kao što je to opisano u poglavlju 4.1. Optimizacija geometrije i molekulske dinamičke simulacije provedene su unutar programa AMBER9 [94]. Nakon minimizacije energije, svaki sustav je zagrijavan tijekom 10 ps, pri čemu je temperatura linearno povećana od 0 do 300 K (NVT ansambl). Uravnoteženi sustavi su simulirani korištenjem NPT uvjeta 8,5 ns (kompleksi **11**-UMP i **11**-AMP), odnosno 13,5 ns (spojevi **9**, **10**, **11** i **12**).

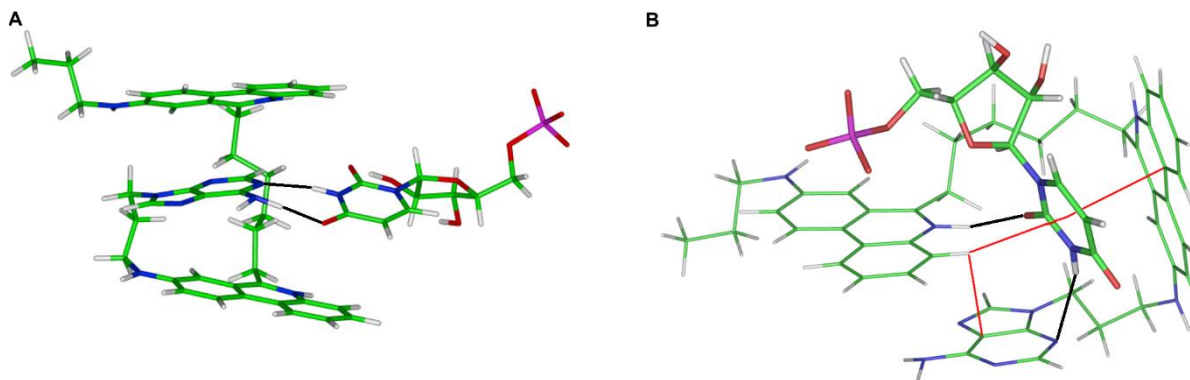


Slika 24. Konformacije bisfenantridinskih spojeva dobivene MD simulacijama.

Tijekom simulacija većina molekula ostala je u *sljepljenom* obliku (tzv. „*stacking*“ konformaciji) (slika 24) bez molekula vode između fenantridinskih jedinica. Dobivene konformacije u skladu su s hipokromnim efektom opaženim u eksperimentalnim istraživanjima i korištene su kao polazišna točka za proučavanje nekovalentnih kompleksa s monofosfatima AMP-om i UMP-om. Kompleksi spoja **11** s UMP-om i AMP-om sagrađeni su na način da adenin iz spoja **11** i baza iz pojedinih monofosfata tvore vodikove veze (Watson-Crick sparivanje). Tijekom simulacija konformacija kompleksa se mijenjala (slika 25). Kompleks **11**-UMP reorganizirao se u zbijeniji oblik, stabiliziran s dvjema intermolekulskim vodikovim vezama: uracil-adenin i uracil-bisfenantridin, te s dvije intermolekulske interakcije slaganja: „licem u lice“ (engl. „*face to face stacking*“) i „licem prema rubu“ (engl. „*face to edge stacking*“) između uracila i dviju fenantridinskih jedinica, te jednom intramolekulskom *stacking* interakcijom između fenantridina i adenina (slika 26).

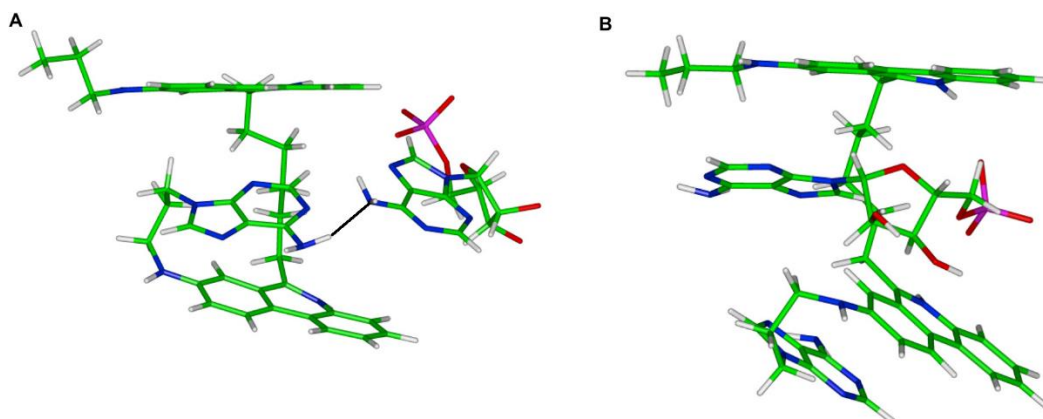


Slika 25. Promjena konformacije kompleksa **11**-UMP tijekom MD simulacija. RMSD predstavlja usrednjeni korijen kvadrata odstupanja (engl. *Root Mean Square Deviation*).



Slika 26. Kompleks **11**-UMP. A) početna konformacija kompleksa s dvjema intermolekulskim vodikovim (Watson-Crick) vezama (—). B) konačna (nakon 8,5 ns MD) konformacija kompleksa stabilizirana s tri interakcije slaganja (—) i dvjema intermolekulskim vodikovim vezama (—).

Konformacija kompleksa spoja **11** i AMP-a također se promijenila tijekom MD simulacija (slika 27), međutim, u manje kompaktni oblik te s manje izraženim preklapanjem aromatskih jedinica u odnosu na kompleks danog spoja s UMP-om. U konačnoj, optimiziranoj strukturi AMP se smjestio na mjesto kovalentno vezanog adenina, u šupljinu između dviju fenantridinskih jedinica, čime je objašnjena pojava hiperkromnog efekta (slika 22).

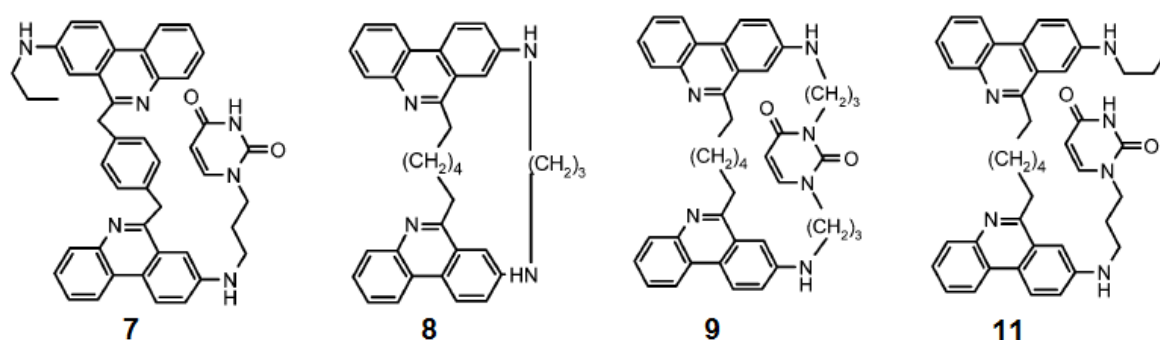


Slika 27. Početna konformacija kompleksa **11**-AMP promijenila se u konformaciju (B), u kojoj je između dviju fenantridinskih jedinica vezan adenin iz AMP. Intermolekulska vodikova veza u početnoj, optimiziranoj konformaciji (A) prikazana je crnom bojom.

Računi molekuskog modeliranja potvrdili su selektivnost spoja **11** prema UMP-u, što se može pripisati zbijenom obliku nastalog kompleksa, stabiliziranog s intra- i intermolekulskim *stacking* interakcijama (na što je ukazala i pojava hipokromnog efekta u UV-Vis titracijama), kao i intermolekulskim vodikovim vezama između uracila i spoja **11**.

4.3. Interakcije bisfenantridinskih spojeva s polinukleotidima

Na temelju prethodnog istraživanja, sintetizirani su novi bisfenantridinski konjugati **7**, **8**, **9** i **11** (slika 28), različite rigidnosti, te su proučavane njihove strukture u vodenom okruženju i interakcije s polinukleotidima DNA i RNA. Pretpostavlja se da je afinitet liganda prema određenim polinukleotidima ovisan o mogućnosti međusobnog prilagođavanja struktura DNA, odnosno RNA, i specifične strukture liganda, pri čemu posebnu ulogu imaju parametri različitih širina i dubina utora polinukleotida te elektrostatski potencijal [100]. Dani spojevi sintetizirani su s ciljem ispitivanja utjecaja kovalentno vezanog uracila na vezanje sa sljedovima komplementarnih i ne-komplementarnih baza (unutar polinukleotida). Eksperimenti su rađeni na pH=5,0 što podrazumijeva protoniranost heteroaromatskih dušika fenantridina, a što se pokazalo ključnim za selektivno prepoznavanje bisfenantridinskih konjugata s polinukleotidima. Također, u takvim slabo kiselim uvjetima moguće je proučavanje interakcija sa specifičnim dvostrukim protoniranim uzvojnica poli rAH⁺-poli rAH⁺.



Slika 28. Bisfenantridinski konjugati (preuzeto iz [99]).

U UV-Vis spektru danih spojeva uočen je hipokromni efekt (u odnosu na referentni monomer Phen-**C3**) [99] na temelju kojeg je pretpostavljeno paralelno slaganje aromatskih (fenantridinskih) jedinica [95]. Najizraženiji hipokromni efekt (78%) dobiven je za spoj **7** [99]. S obzirom da rigidni para-ksilenski most spoja **7** sterički ne dozvoljava efektivno paralelno slaganje fenantridinskih jedinica, takav hipokromizam može se pripisati umetanju uracila između fenantridina, što rezultira snažnim aromatskim interakcijama slaganja (engl. *stacking*). Za razliku od toga, konjugat uracila **11** s fleksibilnim aromatskim linkerom dozvoljava aromatske interakcije slaganja dviju fenantridinskih jedinica, pri čemu je uracil paralelno postavljen iznad fenantridina na koji je kovalentno vezan. Kod svih spojeva uočeno je

povećanje fluorescencije, na temelju čega su pretpostavljene interakcije slaganja fluorescentnih (fenantridinskih) jedinica, što je potvrđeno molekulskim modeliranjem.

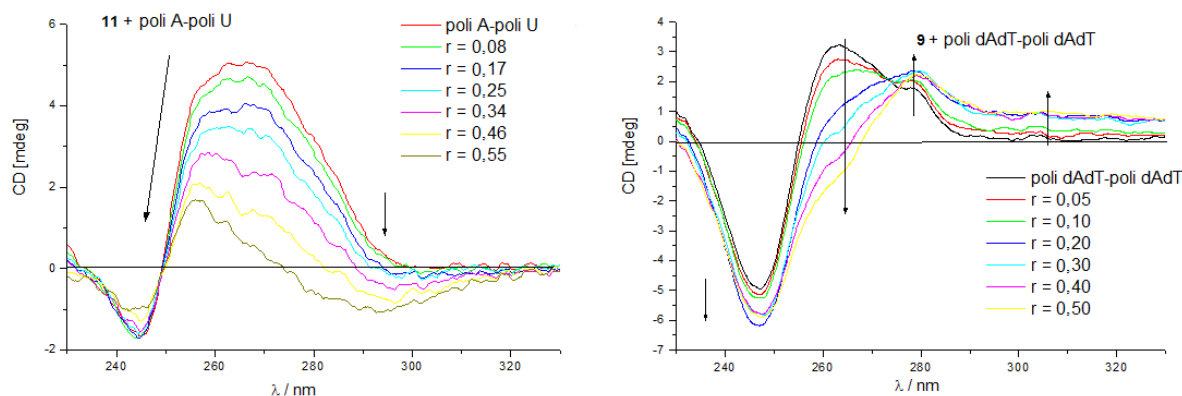
Interakcije danih spojeva s polinukleotidima u vodenom okruženju eksperimentalno su proučene fluorimetrijskim titracijama, termalnom denaturacijom i CD titracijama. Uočen je porast fluorescencije prilikom titracija s polinukleotidima. Bisfenantridinski spojevi **7-9** s rigidnim linkerom i/ili cikličkom strukturom pokazali su dva reda veličine veći afinitet prema uzvojnici poli U nego fleksibilniji spoj **11** (tablica 2), na temelju čega je pretpostavljeno bis-interkaliranje spojeva **7-9** u dani polinukleotid.

Tablica 2. Konstante stabilnosti ($\log K_s$) za komplekse spojeva **7, 8, 9** i **11** s polinukleotidima, izračunate iz fluorimetrijskih titracija. b = manje od 20% formiranih kompleksa, c = premale promjene emisijskog spektra (preuzeto iz [99] i prerađeno).

| | poli dA– poli dT | poli dAdT– poli dAdT | poli dG– poli dC | poli dGdC– poli dGdC | poli A– poli U | poli AH ⁺ – poli AH ⁺ | poli U |
|-----------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------|--|------------------|
| 7 | c | 6,4 | c | c | 5,6 | 5,4 | 5,4 |
| 8 | 5,5 | 5,6 | c | 6,2 | 5,7 | 5,8 | 5,4 |
| 9 | c | 6,6 | 6,6 | 5,3 | 4,8 | 5,5 | 5,0 |
| 11 | 5,8 | 6,4 | 6,3 | 5,4 | > 5 ^c | 5,3 | < 3 ^b |

CD spektroskopija korištena je u svrhu proučavanja promjena u strukturi polinukleotida do kojih dolazi prilikom vezanja malih molekula. Prilikom vezanja akiralnih malih molekula na polinukleotide može se pojaviti inducirani CD spektar (ICD) na temelju kojeg se dobivaju korisne informacije o orijentaciji male molekule s obzirom na kiralnu os polinukleotida te o načinu vezanja (interkaliranje, vezanje u utor) [101]. Na temelju dobivenih konstanti vezanja (tablica 2), proučavane su interakcije spojeva **7-11** s različitim polinukleotidima. Prilikom dodavanja spoja **11** polinukleotidu poli rA-poli rU, čijom denaturacijom nastaje protonirana dvostruka uzvojnica poli rAH⁺-poli rAH⁺, došlo je do velike promjene u RNA CD spektru (slika 29), gdje izoeleptična točka na 248 nm ukazuje na formiranje jedne vrste kompleksa. Izraženi negativni ICD signal opažen je u slučaju titracija spoja **9** s dvostrukom uzvojnicom DNA poli dAdT-poli dAdT (slika 29).

Na temelju eksperimentalnih podataka temperaturnog mekšanja ds-DNA/RNA uočena je stabilizacija dvostruke protonirane uzvojnice RNA poli rAH⁺-poli rAH⁺ od strane spojeva **7** i **11** koji se na istu vežu interkaliranjem, te vezanje spoja **9** u mali utor dvostruke uzvojnice DNA poli dAdT-poli dAdT. Na danim podacima temeljeno je molekulsko modeliranje.



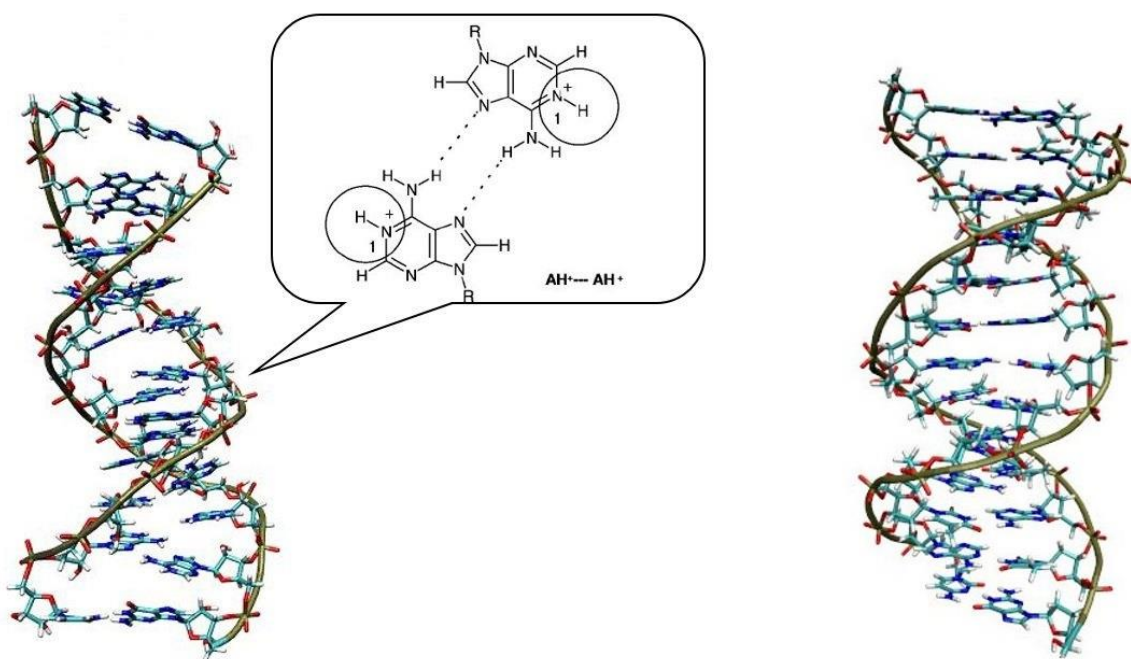
Slika 29. CD titracije: (lijevo) spoja **11** s poli rA-poli rU; (desno) spoja **9** s poli dAdT-poli dAdT. Omjer $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$. LIJEVO: Crnim strelicama na grafovima prikazan je: za 250–290 nm pad intenziteta CD spektra karakterističnog za dani polinukleotid bez vezanog liganda; za 290–320 nm negativni ICD male molekule. DESNO: za 250–290 nm pad intenziteta CD spektra karakterističnog za dani polinukleotid bez vezanog liganda; porast CD signala iznad 280 nm posljedica je induciranog CD spektra male molekule (preuzeto iz [99] i prerađeno).

4.3.1. Molekulsko modeliranje

Molekulsko modeliranje provedeno je za spojeve **7-9** te za komplekse spojeva **7** i **11** s dvostrukom protoniranom uzvojnicom ds-RNA poli rAH⁺-poli rAH⁺ i spoja **9** s dvostrukom uzvojnicom ds-DNA poli dAdT-poli dAdT, kao i za ds-RNA poli rAH⁺-poli rAH⁺ bez vezanog liganda.

Za spoj **11** korišteni su rezultati molekulskog modeliranja iz prethodnog istraživanja [95]. Konjugati **7-9**, dvostruke uzvojnice ds-RNA i ds-DNA i kompleksi sagrađeni su kao što je opisano u poglavlju 4.1. U skladu s opažanjima istraživanja pri blago kiselim uvjetima (pH=5,0) adenin je protoniran na poziciji N1 koristeći modul *Builder* unutar programa InsightII [91]. Sagrađeno je 10 parova baza ds-RNA poli rAH⁺-poli rAH⁺, te 13 parova baza ds-DNA poli dAdT-poli dAdT, s jednim parom C-G na oba kraja svake dvostruke uzvojnice radi stabilizacije relativno kratkih modela polinukleotidnih lanaca (slika 30). Kompleks ds-RNA-**7** izgrađen je smještanjem jednog fenantridinskog prstena spoja **7** u prostor između dvaju susjednih parova baza ds-RNA (interkaliranje), a druga fenantridinska jedinica, u aromatskom slaganju s uracilom, smještena je u mali utor ds-RNA. Kompleks ds-RNA-**11** sagrađen je na isti način. Kompleks ds-DNA-**9** izgrađen je smještanjem spoja **9** u mali utor ds-DNA. Sustavi su otopljeni, neutralizirani (za neutralizaciju sustava s konjugatima korišteni su Cl⁻ ioni, a za

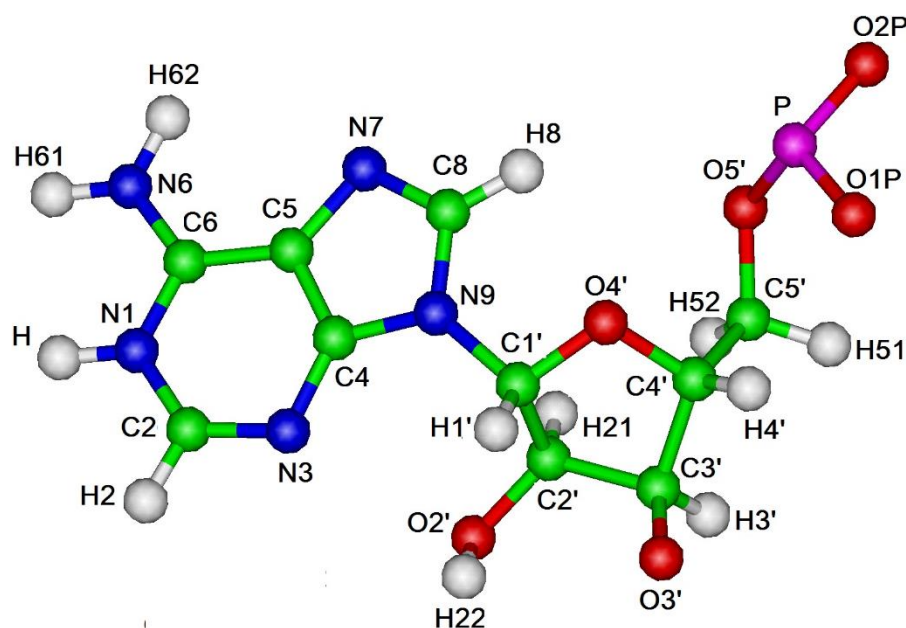
sustave kompleksa (ds-RNA-**7**, ds-RNA-**11**, ds-DNA-**9**) i ds-RNA Na^+ ioni), optimizirani i simulirani na isti način kao što je to opisano u poglavlju 4.1. Optimizacija geometrije danih sustava i MD simulacije provedene su unutar programskog paketa AMBER10 [49]. Za optimizirane sustave konjugata provedeno je 300 ps ekvibracije s linearnim povećanjem temperature od 0 do 300 K. Dvostruka uzvojnica ds-RNA i kompleksi ds-RNA-**7** i ds-RNA-**11** uravnotežavani su tijekom 600 ps u tri koraka, pri čemu je RNA bila fiksirana. Tijekom prvog koraka od 200 ps, temperatura je linearno povećavana s 0 na 100 K, sljedećih 200 ps sa 100 na 200 K i na kraju s 200 na 300 K. Za kompleks ds-DNA-**9** provedeno je 500 ps ekvibracije s postepenim povećanjem temperature od 0 do 300 K. Sve ekvibracije provedene su pri konstantnom volumenu. Uravnoteženi sustavi podvrgnuti su MD simulacijama (za konjugate 30 ns, a komplekse i ds-RNA 24 ns). U svrhu parametrizacije konjugata i kompleksa ds-DNA-**9** korištena su GAFF [48] i ff99SB [5] AMBER polja sila.



Slika 30. Početni sagrađeni modeli dvostrukih uzvojnica. Lijevo: ds-RNA poli rAH^+ -poli rAH^+ s prikazanim sparivanjem protoniranih adenina. Desno: ds-DNA poli dAdT-pol dAdT.

4.3.1.1. Određivanje parametara za nukleobaze s protoniranim adeninima

Budući da u AMBER poljima sila nema odgovarajućih parametara za protonirane adenine koji su sastavni dio ds-RNA poli rAH⁺-poli rAH⁺, trebalo ih je odrediti kvantno mehaničkim pristupom. Struktura preliminarnog modela rAH⁺ (slika 31) optimizirana je najprije semiempirijskim računom korištenjem programskog paketa MOPAC [83], nakon čega je provedena optimizacija sustava kvantno mehaničkom metodom i određivanje parcijalne raspodjele naboja. U tu svrhu korištena je HF metoda i bazni skup 6-31G(d) unutar programa GAUSSIAN [82]. Parcijalni naboji određeni su dvjema metodama: metodom određivanja naboja na temelju elektrostatskog potencijala sustava (ESP) [102] i Mullikenovom metodom, tj. korištenjem linearne kombinacije atomskih orbitala [103]. Dani naboji prikazani su u tablici 3. U MD simulacijama korišteni su ESP naboji. Ostali potrebni parametri (za atome, veze, kutove) za simulaciju poli rAH⁺-poli rAH⁺ prikazani su u tablici 4. Svi parametri usklađeni su s postojećima u AMBER poljima sila.



Slika 31. Modelni sustav rAH⁺ korišten za kvantno mehaničke račune. Prikazana su imena pojedinih atoma. Adenin je protoniran na položaju N1.

Tablica 3. Vrijednosti parcijalnih atomskih naboja (ESP i Mulliken) određene QM računom, HF metodom uz korištenje baznog skupa 6-31G(d) za nukleotid s protoniranim adeninom rAH^+ , izražene preko jediničnog, e^+ , naboja.

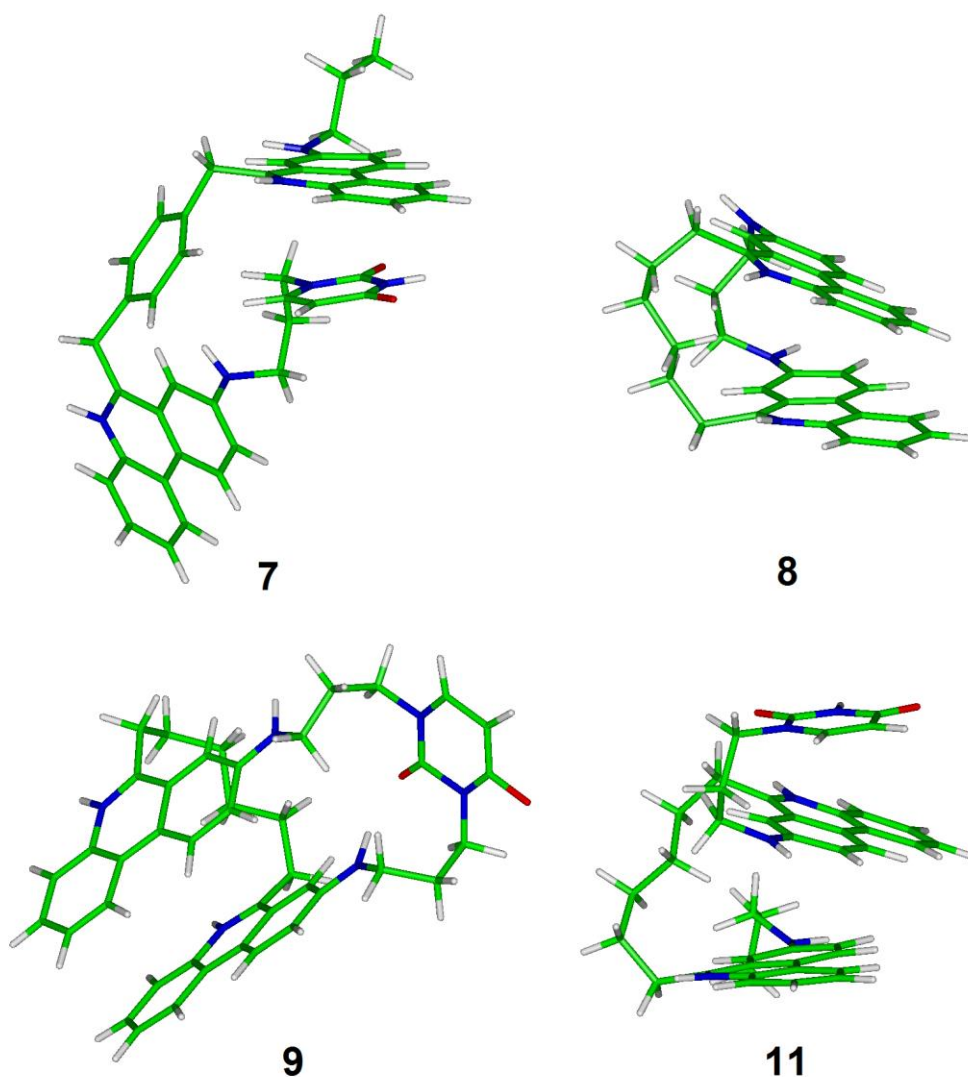
| Ime atoma | ESP naboji | Mulliken naboji |
|-----------|------------|-----------------|
| P | 1,152084 | 1,431393 |
| O1P | -0,542651 | -0,597375 |
| O2P | -0,553623 | -0,596893 |
| O5' | -0,359532 | -0,674920 |
| C5' | -0,132427 | -0,063654 |
| C4' | 0,103212 | 0,119742 |
| O4' | -0,476126 | -0,695215 |
| C1 | 0,366287 | 0,384272 |
| N9 | -0,399005 | -0,749425 |
| C8 | 0,403972 | 0,363528 |
| N7 | -0,639266 | -0,588126 |
| C5 | 0,018186 | 0,099158 |
| C6 | 0,706746 | 0,770449 |
| N6 | -0,958799 | -0,928604 |
| N1 | -0,650846 | -0,819026 |
| C2 | 0,459180 | 0,326588 |
| N3 | -0,628821 | -0,552269 |
| C4 | 0,582660 | 0,707094 |
| C3' | 0,514659 | 0,173823 |
| C2' | 0,264171 | 0,112680 |
| O3' | -0,903473 | -0,875230 |
| O2' | -0,704572 | -0,717037 |
| H51 | 0,231265 | 0,232603 |
| H52 | 0,074374 | 0,163816 |
| H4' | 0,079978 | 0,236310 |
| H1' | 0,126577 | 0,246703 |
| H8 | 0,170362 | 0,284185 |
| H61 | 0,448392 | 0,413474 |
| H62 | 0,458280 | 0,457987 |
| H1 | 0,447479 | 0,452059 |
| H2 | 0,132692 | 0,277072 |
| H3' | -0,159075 | 0,076828 |
| H21 | -0,064228 | 0,119124 |
| H22 | 0,404887 | 0,408886 |

Tablica 4. Parametri za poli rAH⁺-poli rAH⁺ korišteni u MD simulacijama.

| Vezni parametri | | | |
|--------------------|--|---|--------------|
| VEZA | Konstanta sile (kcal mol ⁻¹ Å ⁻²) | Ravnotežna duljina veze (Å) | |
| CT-OX | 320,0 | 1,410 | |
| HX-OH | 553,0 | 0,960 | |
| CQ-NA | 502,0 | 1,324 | |
| NC-H5 | 394,1 | 1,018 | |
| CT-HO | 340,0 | 1,090 | |
| OH-H1 | 553,0 | 0,960 | |
| VALENTNI KUT | Konstanta sile (kcal mol ⁻¹ rad ⁻²) | Ravnotežna vrijednost kuta (°) | |
| H1-CT-OX | 50,0 | 109,50 | |
| CT-CT-OX | 50,0 | 109,50 | |
| CB-CA-NA | 70,0 | 117,30 | |
| NC-CQ-NA | 70,0 | 129,10 | |
| H5-CQ-NA | 50,0 | 115,45 | |
| CA-NA-CQ | 70,0 | 118,60 | |
| CQ-NA-H | 50,0 | 118,00 | |
| CA-NC-H5 | 50,0 | 118,00 | |
| CQ-NC-H5 | 50,0 | 118,00 | |
| OH-CT-HO | 50,0 | 109,50 | |
| CT-OH-H1 | 55,0 | 108,50 | |
| CT-CT-HO | 50,0 | 109,50 | |
| CT-CT-H0 | 50,0 | 109,50 | |
| O2-P-OS | 45,0 | 102,60 | |
| O2-P-O2 | 45,0 | 102,60 | |
| NC-CA-NC | 70,0 | 129,10 | |
| H5-NC-H5 | 35,0 | 109,50 | |
| TORZIJSKI KUT | Visina barijere (kcal mol ⁻¹ rad ⁻²) | Faza (°) | Periodičnost |
| OX-CT-CT-OS | 0,144 | 0,0 | -3 |
| OX-CT-CT-OS | 1,175 | 0,0 | 2 |
| H1-CT-CT-OX | 0,250 | 0,0 | 1 |
| OX-CT-CT-OH | 0,144 | 0,0 | -3 |
| OX-CT-CT-OH | 1,175 | 0,0 | 2 |
| X-NA-CQ-X | 9,600 | 80,0 | 2 |
| Ne-vezni parametri | | | |
| ATOM | Atomski radijus (Å) | Visina energetske barijere (kcal mol ⁻¹ Å ⁻²) | |
| OX | 1,6837 | 0,1700 | |
| ATOM | Atomska masa | Polarizabilnost (Å ³) | |
| OX | 16,00 | 0,465 | |
| HX | 1,008 | 0,135 | |

4.3.2. Rezultati MD simulacija konjugata 7-9

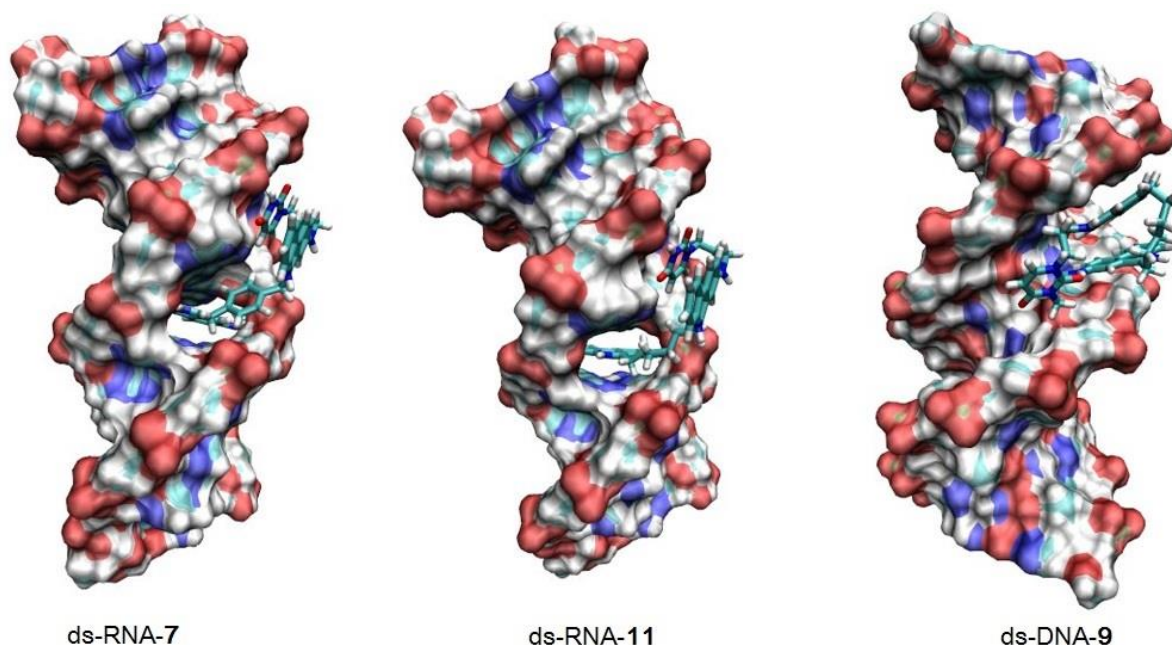
Početne konformacije konjugata bile su pripremljene u zbijenom obliku, s paralelno položenim prstenima. Tijekom simulacija, dane molekule većinom su zadržale takvu slijepljenu konformaciju bez molekula vode između aromatskih jedinica (slika 32). Paralelno slaganje najviše je bilo izraženo između dviju fenantridinskih jedinica. Spoj **7** stabiliziran je s dvjema intramolekulskim interakcijama slaganja: „licem u lice“ između uracila i fenantridinskog prstena te „licem u rub“ između uracila i benzenskog prstena. Za molekule **8** i **9** značajne su intramolekulske interakcije paralelnog slaganja dvaju fenantridinskih prstena. Spoj **9** dodatno je stabiliziran jednom intramolekulskom vodikovom vezom između uracila i susjednog fenantridinskog prstena. Dobivene konformacije spojeva **7** i **11** korištene su za modeliranje kompleksa s ds-RNA, a spoja **9** za kompleks s ds-DNA.



Slika 32. Konformacije proučavanih spojeva dobivene MD simulacijama.

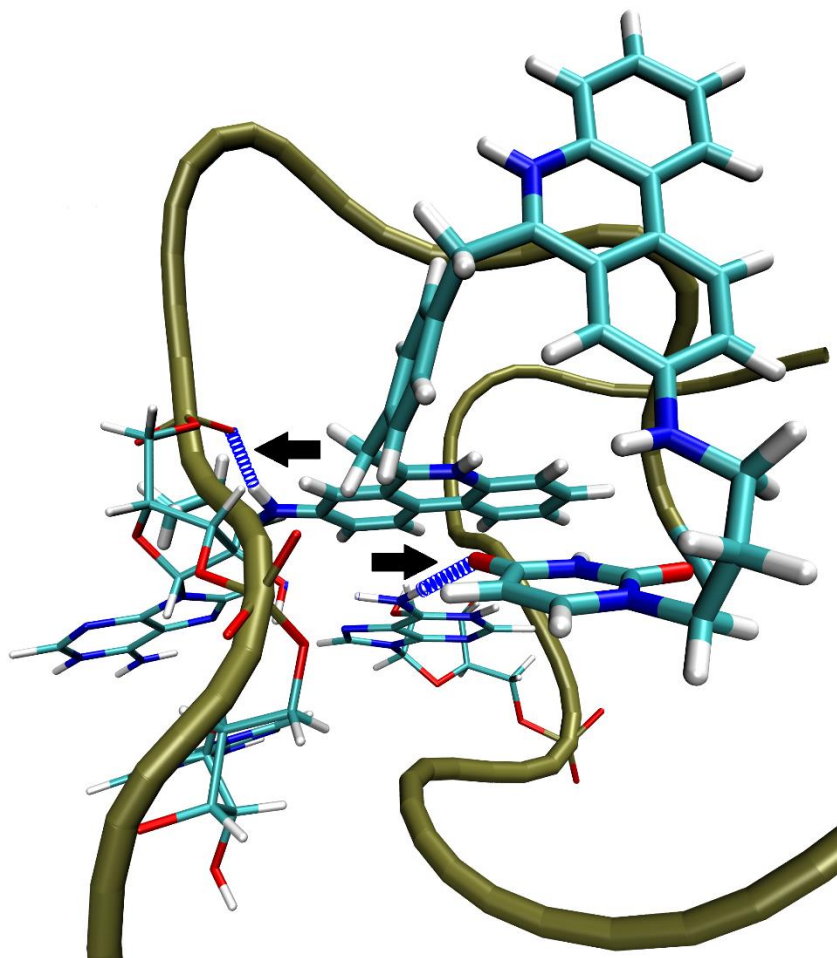
4.3.3. Rezultati MD simulacija ds-RNA i kompleksa ds-RNA-7, ds-RNA-11 i ds-DNA-9

Početne orijentacije bisfenantridin-uracil konjugata vezanih na poli rAH⁺-poli rAH⁺ (slika 33) promijenile su se tijekom MD simulacija, međutim, stabilnost kompleksa nije narušena.



Slika 33. Početne optimizirane strukture modeliranih kompleksa.

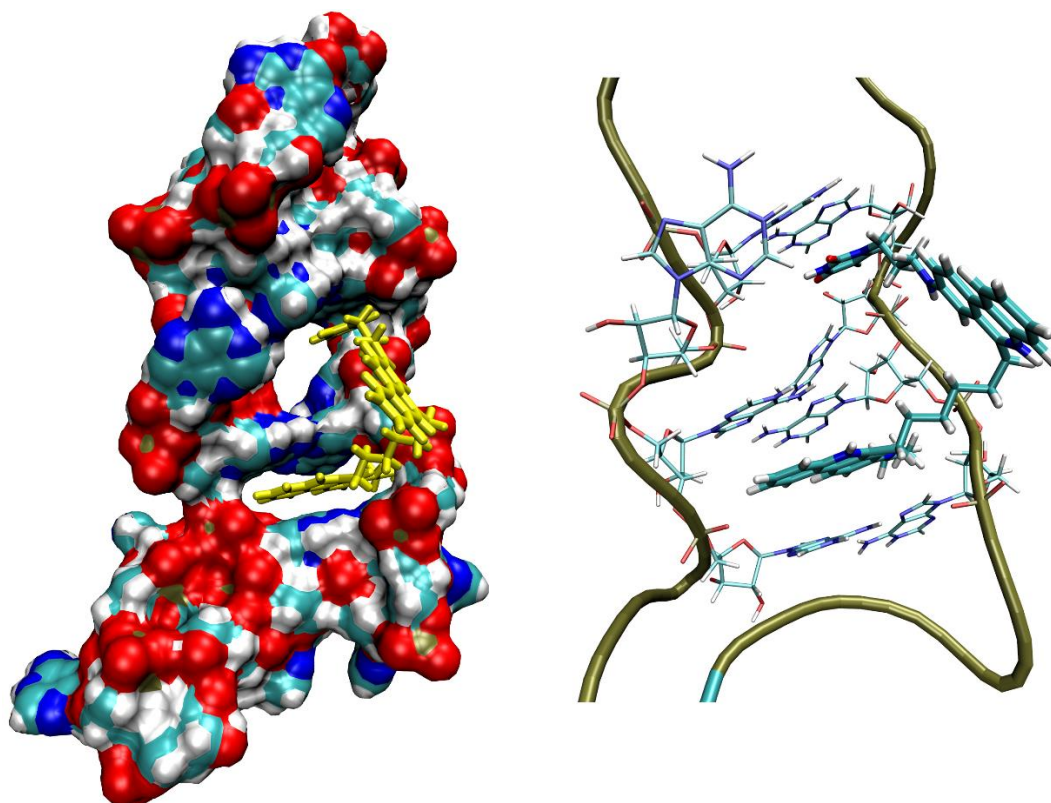
Fenantridinska jedinica spoja **7** ostala je u potpunosti interkalirana u ds-RNA dok se ostatak molekule lijepo smjestio u mali utor ds-RNA (slika 34). U takvoj orijentaciji stvorene su dvije intermolekulske vodikove veze: jedna između interkalirane fenantridinske jedinice spoja **7** i fosfatne grupe susjednog nukleotida, a druga između uracila spoja **7** i NH₂ grupe iz susjedne nukleobaze adenina. Tijekom MD simulacija kompleksa ds-RNA-**11** (slika 33), interkalirana fenantridinska jedinica zadržala je dani način vezanja, a nakon približno 1 ns i uracil spoja **11** spontano je interkalirao u ds-RNA dok je druga fenantridinska jedinica ostala izložena otapalu (slika 35).



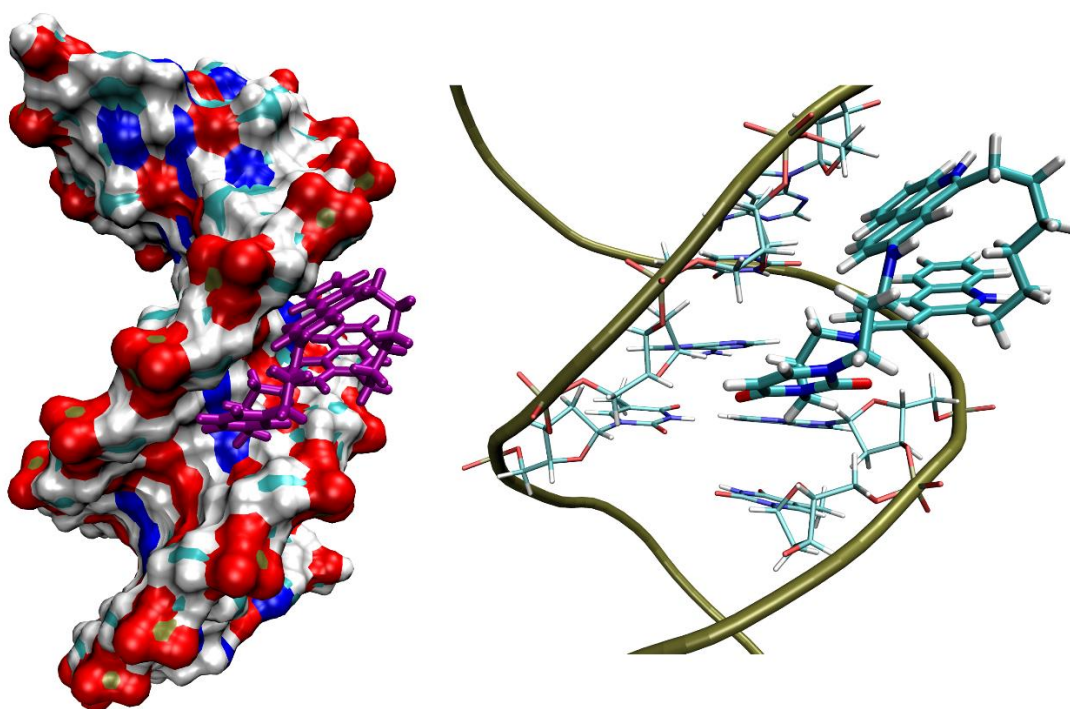
Slika 34. Prikaz veznog mjesta spoja **7** u ds-RNA u konačnoj optimiziranoj konformaciji. Stvorene su dvije intermolekulske vodikove veze (prikazane plavom bojom, dodatno označene crnim strelicama).

Molekulskim modeliranjem potvrđena je stabilnost vezanja spoja **9**, s paralelno složenim fenantridinskim jedinicama smještenim u mali utor ds-DNA (slika 33). Tijekom 24 ns MD simulacija na sobnoj temperaturi, spoj je ostao vezan u mali utor koji se prilagodio obliku spoja bez značajnijih promjena u strukturi ds-DNA (slika 36). Vezanje spoja **9** u mali utor poli dAdT-poli dAdT dodatno je stabilizirano elektrostatskim interakcijama između fosfatnih grupa polinukleotida i pozitivno nabijenih fenantridinskih jedinica.

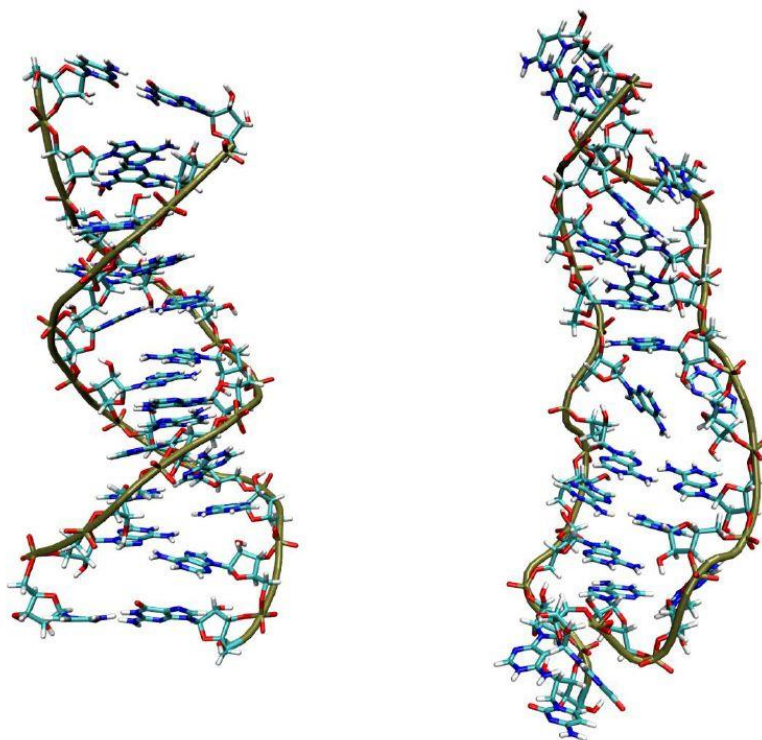
MD simulacije ukazale su na povećanje stabilnosti polinukleotida poli rAH⁺-poli rAH⁺ u slučaju vezanog liganda u odnosu na rezultate modeliranja ds-RNA bez vezanog liganda (slika 37) [99].



Slika 35. Konačna optimizirana struktura kompleksa ds-RNA-11. Desno je detaljniji prikaz veznog mjesta liganda **11** s dvjema interkaliranim jedinicama.



Slika 36. Konačna optimizirana struktura kompleksa ds-DNA-9. Desno je detaljniji prikaz malog utora u koji je vezan spoj **9**.



Slika 37. Model dvostruke uzvojnice poli rAH⁺-poli rAH⁺. Lijevo: početna optimizirana struktura; desno: konačna optimizirana struktura (nakon 24 ns MD simulacija).

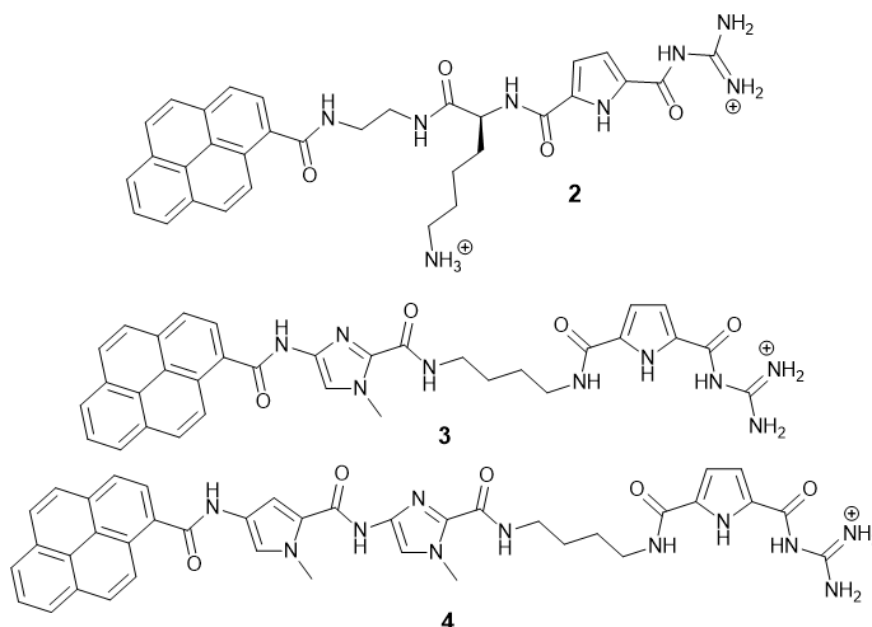
Slobodne energije vezanja (entalpijski doprinos) za dane komplekse izračunate su MM_PBSA metodom [68], korištenjem točaka generiranih tijekom zadnje 2 ns MD simulacija (engl. *snapshots*). Dobivene vrijednosti slobodnih energija vezanja ukazuju na stabilnost proučavanih sustava (tablica 5). Uspoređujući komplekse spojeva **7** i **11** s ds-RNA poli rAH⁺-poli rAH⁺ uočavamo da je kompleks sa spojem **11** stabilniji, tj. ima nižu slobodnu energiju vezanja što je najvjerojatnije posljedica dodatnog interkaliranja uracila iz **11** (uz već interkaliranu fenantridinsku jedinicu) (slika 35).

Tablica 5. Entalpijski doprinos slobodnoj energiji vezanja izračunat za komplekse ds-RNA-**7**, ds-RNA-**11** i ds-DNA-**9**. (Objašnjenje pojedinog doprinosa dano je u odjeljku 3.1.4.)

| Energija (kcal/mol) | ds-RNA-7 | ds-RNA-11 | ds-DNA-9 |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| ELE | (-152,8±17,3) | (-79,8±14,1) | (-1015,7±14,5) |
| VDW | (-62,0±2,9) | (-73,9±2,9) | (-55,4±2,7) |
| PBSUR | (-7,0±0,2) | (-8,1±0,3) | (-5,5±0,2) |
| PBSOL | (171,5±17,3) | (107,4±13,3) | (1023,2±15,4) |
| PBTOT | (-43,4±3,6) | (-46,3±3,5) | (-48,0±2,7) |

4.4. Interakcije guanidiniokarbonil-pirol-arilnih konjugata s ds-DNA

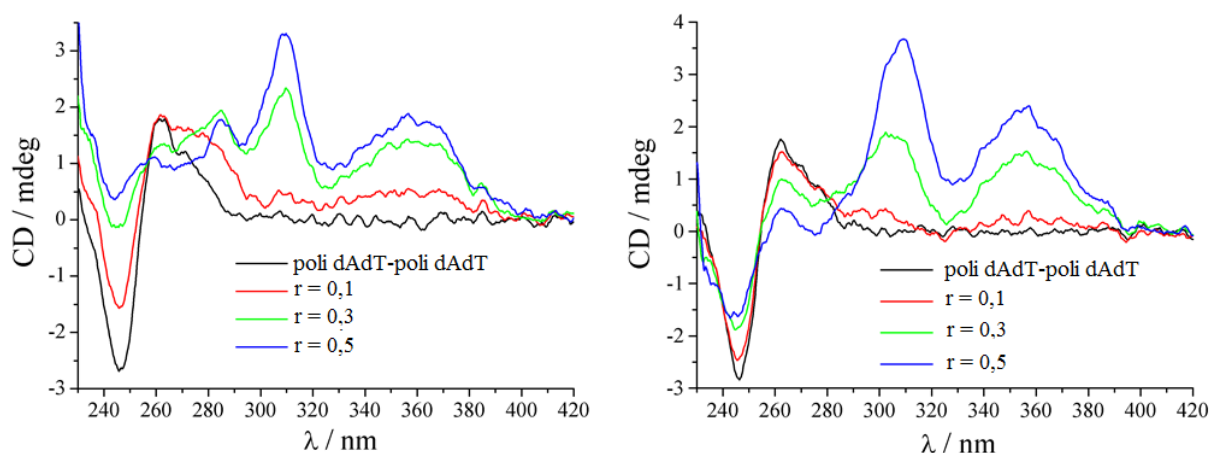
Guanidiniokarbonil-pirol-arilni konjugati **2**, **3** i **4** (slika 38) sintetizirani su u svrhu spektroskopskih proba za dvostruke uzvojnice polinukleotida, a njihove interakcije s ds-DNA/RNA okarakterizirane su metodama fluorimetrijske titracije, UV-Vis i CD spektroskopije [96]. Za dane spojeve utvrđeno je da stabiliziraju dvostruku uzvojnicu ds-DNA. Na temelju eksperimentalnih podataka, predviđeno je vezanje spoja **2** na način da pirenskim prstenom interkalira dok se ostatkom molekule veže u mali utor ds-DNA. Za izduženije i rigidnije spojeve **3** i **4** utvrđeno je njihovo vezanje u mali utor ds-DNA budući su njihovom titracijom s poli dAdT-poli dAdT dobiveni pozitivni ICD spektri (slika 39). Konstante vezanja izračunate iz fluorimetrijskih titracija ukazuju na biološki značajan afinitet danih spojeva prema ds-DNA (tablica 6).



Slika 38. Guanidiniokarbonil-pirol-arilni konjugati.

Tablica 6. Konstante stabilnosti ($\log K_s$), omjeri $n=[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ kompleksa spojeva s dvostrukim uzvojnicama polinukleotida, izračunate iz fluorimetrijskih titracija na pH=5,0, b = premale promjene emisijskog spektra (preuzeto iz [96] i prerađeno).

| | dAdT– dAdT $\log K_s (n)$ | dGdC– dGdC $\log K_s (n)$ | dAdT $\log K_s (n)$ | rA–rU $\log K_s (n)$ |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|-------------------------|
| 2 | 6,5 (0,3) | 6,3 (0,2) | b | 5,4 (0,2) |
| 3 | 6,0 (0,2) | 5,5 (0,2) | b | b |
| 4 | b | b | 6,9 (0,1) | b |



Slika 39. Promjene u CD spektru polinukleotida prilikom dodavanja spoja **3** (lijevo) i spoja **4** (desno) (preuzeto iz [96] i prerađeno).

Na temelju eksperimentalno pretpostavljenih načina vezanja provedeno je molekulsko modeliranje triju kompleksa: **2**-poli dAdT-poli dAdT, **3**-poli dAdT-poli dAdT i **4**-poli dAdT-poli dAdT.

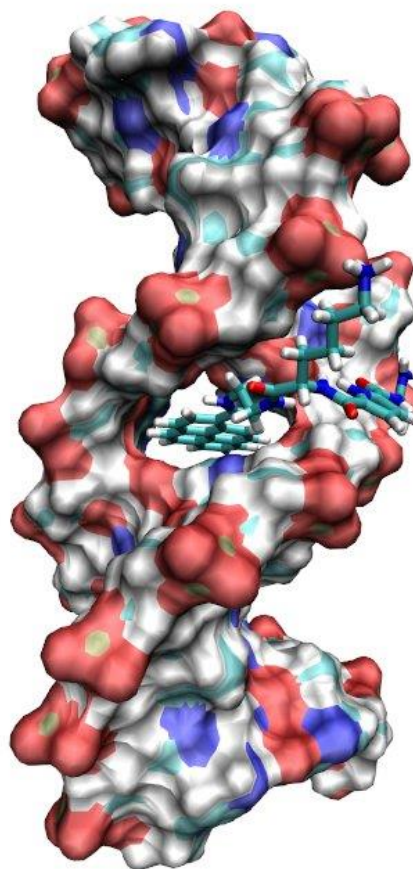
4.4.1. Metode molekulskog modeliranja

Dvostruka uzvojnica DNA (13 parova naizmjenice poredanih baza A i T, s jednim parom baza G-C na svakom kraju radi bolje stabilnosti) i spojevi **2**, **3** i **4** sagrađeni su na način opisan u poglavlju 4.1. Pirenski prsten spoja **2** interkaliran je u prostor između dvaju parova baza, a ostatak molekule smješten je u mali utor ds-DNA, dok su spojevi **3** i **4** smješteni u mali utor ds-DNA. Za parametrizaciju kompleksa korištena su AMBER polja sila ff99 [89] i GAFF [48]. Otapanje, neutralizacija (Na^+ ioni), optimizacija i simulacija sustava provedeni su na isti način kao i kod kompleksa polinukleotida s konjugatima bisfenantridina. Uravnoteživanje sustava trajalo je 0,5 ns. Za kompleks ds-DNA-**2** provedeno je 12,5 ns MD simulacija, a za ds-DNA-**3** i ds-DNA-**4**) 10,5 ns.

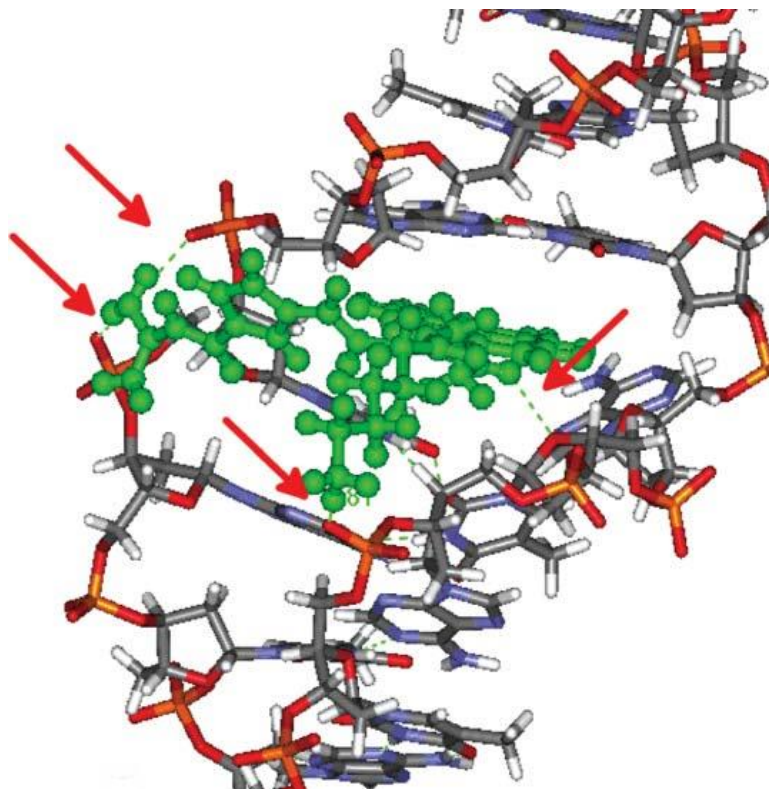
4.4.2. Rezultati MD simulacija kompleksa ds-DNA-2

Tijekom 12,5 ns MD simulacija provedenih na sobnoj temperaturi, početni način vezanja spoja **2** na poli dAdT-poli dAdT nije se promijenio. Pirenski dio ostao je u potpunosti interkaliran u ds-DNA, dok je ostatak molekule ostao stabilno vezan u malom utoru, tvoreći nekoliko intermolekulskih vodikovih veza. Konačna struktura stabilizirana je s četiri takve veze. (slika 40): dvije između terminalne NH_2 grupe između guanidiniokarbonil-pirolnog repa i susjedne polinukleotidne fosfatne grupe, treća između alifatske NH_3^+ grupe spoja **2** i fosfatne grupe ds-DNA, a četvrta između amino grupe amida vezanog na pirenski dio spoja **2** i deoksiriboze iz susjedne nukleobaze (slika 41). Uz navedene, tijekom MD simulacija, pojavljivale su se i druge intermolekulske vodikove veze. Tako je nakon 500 ps (poslije ekvilibracije), stvorena intermolekulska vodikova veza između krajnje NH_2 grupe i susjedne nukleobaze, te je ostala stabilna narednih 5 ns, nakon čega je formirana vodikova veza između alifatske NH_3^+ grupe spoja **2** i fosfatne grupe iz susjednog nukleotida. Nakon 8 ns MD simulacija, stvorena je vodikova veza između druge krajnje NH_2 grupe spoja **2** i fosfatne grupe susjednog nukleotida, a nakon 10 ns intermolekulska vodikova veza između amino grupe iz prve amidne veze pirenskog dijela spoja **2** i susjedne nukleobaze.

Dobiveni rezultati u skladu su s eksperimentalnim pretpostavkama. Kompleks ds-DNA-**2** dodatno je stabiliziran i elektrostatskim interakcijama pozitivno nabijenog amina spoja **2** s ds-DNA. Sama struktura ds-DNA nije se značajno narušila vezanjem spoja **2** (slika 40).



Slika 40. Optimizirana struktura kompleksa ds-DNA-**2** (nakon 12,5 ns MD simulacija). Spoj **2** tijekom simulacije ostaje stabilno vezan, pri čemu je pirenski dio interkaliran, dok je ostatak molekule smješten u mali utor ds-DNA.

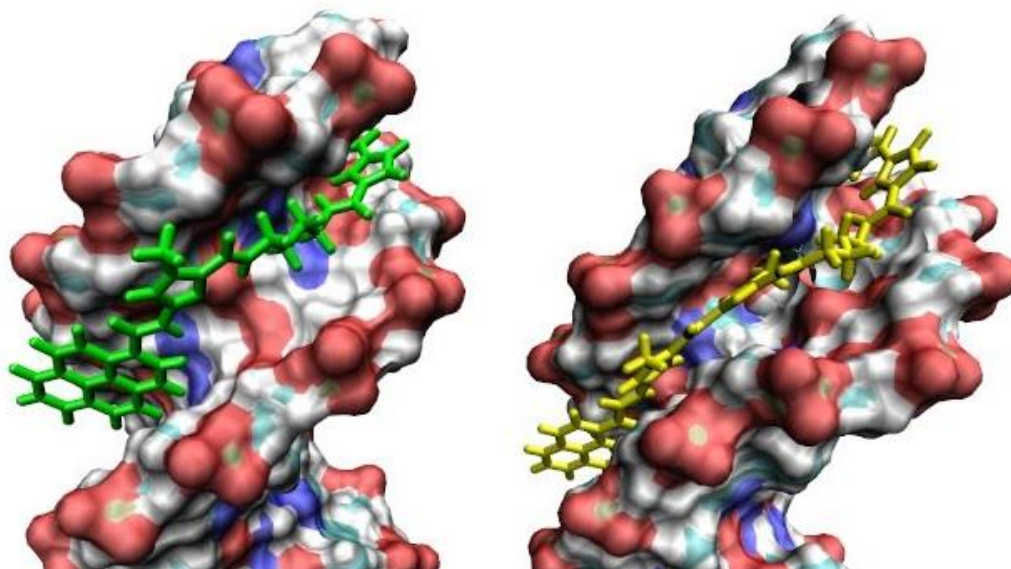


Slika 41. Kompleks ds-DNA-2 dobiven nakon 12,5 ns MD simulacija. Crvene strelice ukazuju na stvorene intermolekulske vodikove veze.

4.4.3. Rezultati MD simulacija za komplekse ds-DNA-3 i ds-DNA-4

Tijekom 10,5 ns MD simulacija, spojevi **3** i **4** oblikom su se prilagodili malom utoru ds-DNA poli dAdT-poli dAdT (slika 42) i tu se stabilno vezali. U konačnim, optimiziranim strukturama danih kompleksa, prisutne su četiri intermolekulske vodikove veze. U kompleksu ds-DNA-3, NH skupina iz pirolnog prstena guanidiniokarbonil-pirolnog repa tvori vodikove veze sa dvjema susjednim bazama, tj. s karbonilnim kisicima iz dvaju susjednih timina. Isti kisici vezani su vodikovim vezama s amino grupom iz amidne veze pirenskog dijela i krajnjeg guanidina spoja **3**. Također, u konačnoj, optimiziranoj strukturi kompleksa ds-DNA-3 uočena je NH- π interakcija između krajnje NH₂ skupine spoja **3** sa susjednim guaninom iz ds-DNA. Kompleks ds-DNA-4 stabiliziran je sljedećim intermolekulskim vodikovim vezama: između amino grupe iz amidne veze kojom je povezan pirenski dio spoja **4** i karbonilnog kisika iz susjedne baze timina; s dvije veze između krajnjeg guanidina i susjednih DNA baza, adenina i timina te vodikovom vezom između NH iz krajnje amidne veze i susjedne baze timina. Također, uočena je „rub u lice“ interakcija slaganja između pirena i susjednog adenina. Vezanje spojeva

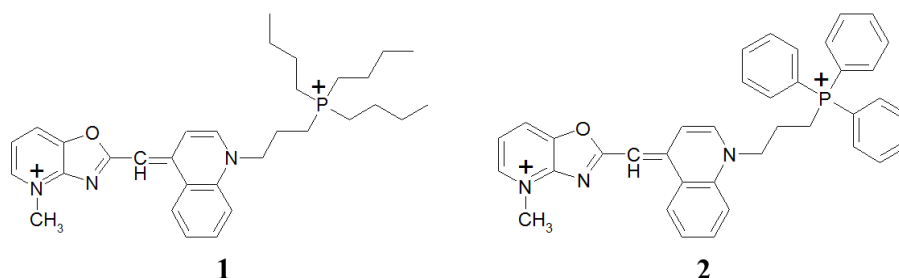
3 i **4** u mali utor ds-DNA dodatno je stabilizirano elektrostatskim interakcijama između negativno nabijenih fosfatnih grupa polinukleotida i pozitivnih amina.



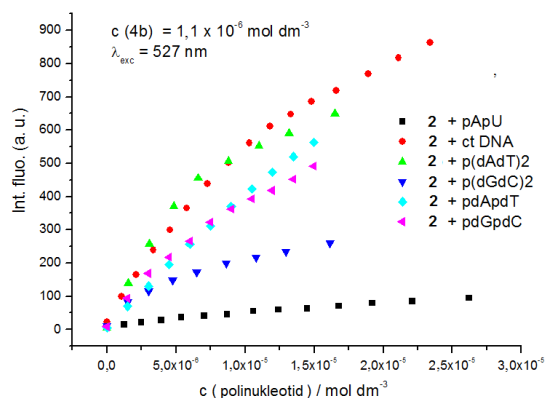
Slika 42. Vezna mjesta mali utor - vežućih spojeva **3** (lijevo) i **4** (desno), vezanih na poli dAdT-poli dAdT.

4.5. Interakcije cijaninskih spojeva s ds-DNA

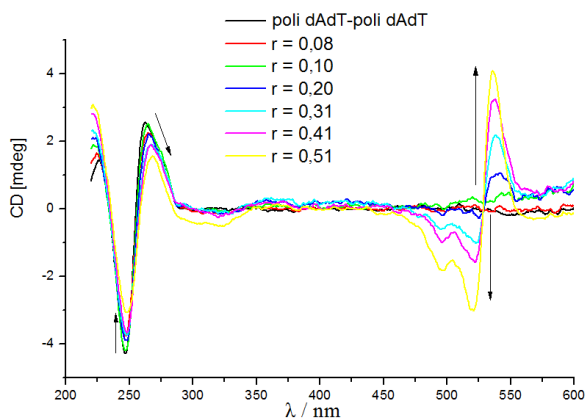
Cijaninski spojevi **1** i **2** (slika 43) sintetizirani su sa svrhom specifičnog prepoznavanja dugih lanaca DNA/RNA, pri čemu daju karakterističan spektrofotometrijski odgovor prilikom vezanja na različite polinukleotide (slika 44). Kompleksi su eksperimentalno proučeni metodama termalne denaturacije, fluorimetrijskim titracijama te UV-Vis i CD spektroskopijom. U eksperimentima termalne denaturacije dodavanje spojeva **1** i **2** rezultiralo je stabilizacijom ds-DNA molekula, dok to nije bio slučaj za ds-RNA. Također, efekt termalne stabilizacije bio je puno izraženiji kod spoja **2** što upućuje na važnost doprinosa aromatskih fosfonijevih supstituenata.



Slika 43. Novosintetizirani cijaninski spojevi **1** i **2** (preuzeto iz [97]).



Slika 44. Promjene u emisiji fluorescencije spoja **2** nakon dodavanja ds-polinukleotida na pH=7,0 (preuzeto iz [97] i prerađeno).



Slika 45. CD titracija polinukleotida sa spojem **2**; omjer $r = [\text{ligand}] / [\text{polinukleotid}]$ na pH=7,0. Crne strelice desno na grafu ukazuju na pojavu ICD spektra. Crne strelice na lijevoj strani grafa pokazuju pad intenziteta CD spektra karakterističnog za dani polinukleotid bez vezanog liganda (preuzeto iz [97] i prerađeno).

CD titracijama polinukleotida ds-DNA poli dAdT-poli dAdT sa spojem **2** dobiven je dominantni pozitivni ICD spektar ($\lambda = 540-574\text{ nm}$) za omjere $r_{[\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}]} \leq 0,2$, dok se daljnjim dodavanjem liganda ($r > 0,2$) pojavila negativna ICD vrpca na $450-525\text{ nm}$ (slika 45). Navedeni rezultati upućuju da se spoj **2** u slučaju manjih omjera liganda i DNA veže kao monomer, a nakon popunjavanja svih veznih mjesta za monomer, pri većim omjerima, dolazi do vezanja liganda u obliku dimera. Kako bi navedene pretpostavke provjerili, proveli smo modeliranje spoja **2** vezanog u obliku monomera i dimera u mali utor ds-DNA poli dAdT-poli dAdT.

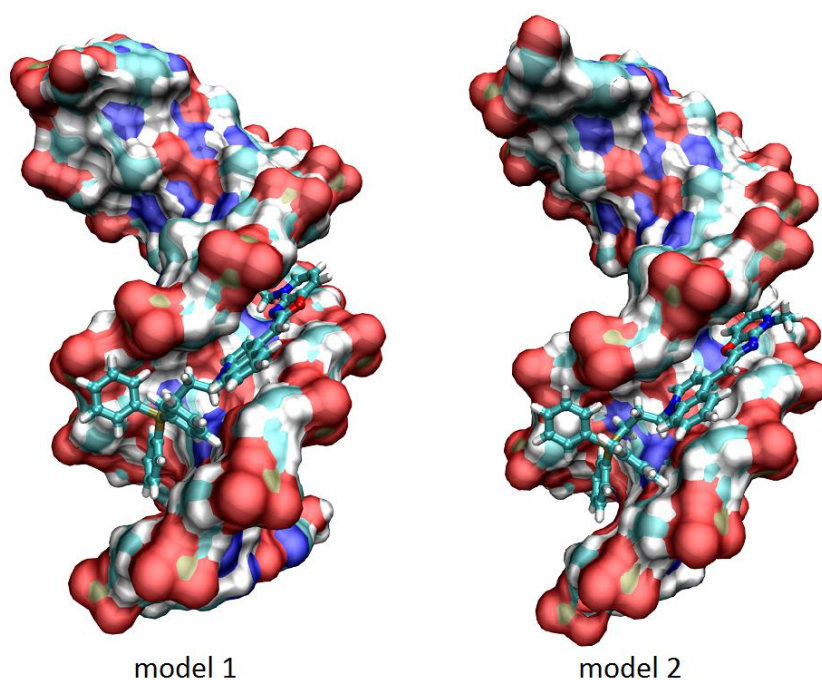
4.5.1. Metode molekulskog modeliranja

U svrhu modeliranja kompleksa ds-DNA-**2**, korištena je prethodno sagrađena dvostruka uzvojnica poli dAdT-poli dAdT [96]. Spoj **2** u obliku monomera i dimera, kao i kompleksi, sagrađeni su na način opisan u poglavlju 4.1. Dani ligandi smješteni su u mali utor ds-DNA. Kompleks s monomerom sagrađen je na dva načina, tj. s dvije različite orijentacije metilne skupine s piridinskog dušika spoja **2**. U prvom načinu vezanja (model 1), metilna skupina spoja **2** usmjerena je u unutrašnjost malog utora, dok je u drugom (model 2) zarotirana za 180° , tj. usmjerena je u otapalo (slika 46). U svrhu parametrizacije kompleksa, korištena su AMBER polja sila ff99SB [5] i GAFF [48]. Geometrijska optimizacija i MD simulacije provedene su pomoću programskog paketa AMBER10 [49], kao što je ranije opisano. Za komplekse s monomerom provedeno je 8,5 ns, a za kompleks s dimerom 23,6 ns MD simulacija. Radi testiranja stabilnosti kompleksa s dimerom, dani sustav je zagrijavan nakon 8,5 ns MD simulacija. Temperatura je linearno povećavana s 300 K na 340 K tijekom 300 ps. Zagrijani sustav je zatim simuliran 500 ps na temperaturi 340 K. Tijekom narednih 300 ps, temperatura je snižavana s 340 K na 300 K, nakon čega je provedeno preostalih 14 ns MD simulacija.

4.5.2. Rezultati molekulskog modeliranja kompleksa cijaninskog spoja **2** s ds-DNA

Rezultati MD simulacija provedeni na sobnoj temperaturi za cijaninski spoj **2** vezan u obliku monomera u mali utor ds-DNA poli dAdT-poli dAdT pokazali su da su oba načina vezanja, model 1 i model 2 (slika 46), podjednako stabilna u vodi, usprkos činjenici da je relativno velika hidrofobna površina liganda dostupna otapalu. U oba slučaja ligand je

stabiliziran CH_3 - π interakcijama između metila iz kinolina te dvaju fenilnih prstena iz supstrata i okosnicom ds-DNA, tj. vodicima iz deoksiriboze. Dodatna stabilizacija kod modela 2 postignuta je dvjema polarnim CH-O interakcijama, a kod modela 1 polarnim CH-O i CH-N interakcijama. Slobodne energije vezanja (entalpijski doprinos) izračunate pomoću MM_PBSA metode [68] za zadnjih 2 ns MD simulacija, uz pretpostavku da su entropijski doprinosi jednaki, ukazale su na podjednaku vjerojatnost oba načina vezanja (tablica 7).



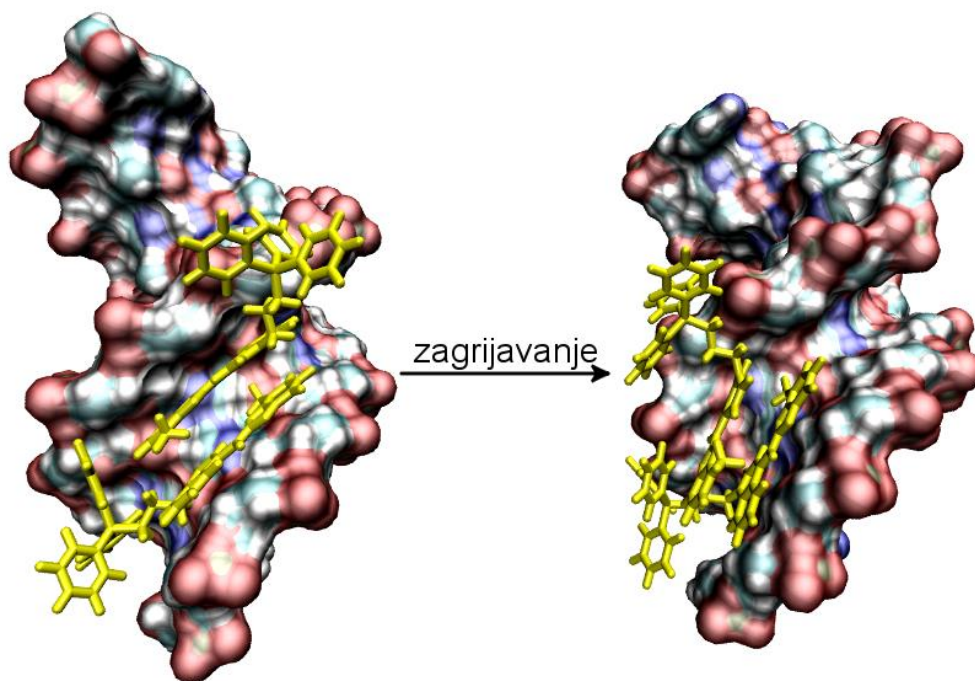
Slika 46. Dva načina vezanja monomera **2** u mali utor ds-DNA.

Tablica 7. Slobodne energije vezanja (entalpijski doprinos) izračunate za model 1 i model 2. (Objašnjenje pojedinog doprinosa dano je u odjeljku 3.1.5.)

| Energija (kcal/mol) | model 1 | model 2 |
|---------------------|--------------------|--------------------|
| ELE | (-1126,1±10,7) | (-1119,8±12,5) |
| VDW | (-66,7±2,5) | (-67,0±3,4) |
| PBSUR | (-7,2±0,1) | (-7,2±0,2) |
| PBSOL | (1140,4±11,5) | (1135,5±13,8) |
| PBTOT | (-52,3±2,5) | (-51,1±3,8) |

Molekulskim modeliranjem željela se provjeriti i mogućnost vezanja spoja **2** u obliku dimera u mali utor ds-DNA, na što su ukazivali eksperimentalni rezultati. Takav kompleks ostao je stabilan tijekom 23,6 ns MD simulacija, uz malo proširenje utora (oko 5%) prilikom vezanja

dimera. Kao što je opisano u metodama (odjeljak 4.5.1.), radi dodatnog ispitivanja stabilnosti dani sustav je zagrijavan što je dovelo do „klizanja“ dimera spoja **2** niz utor (slika 47), no ne i do raspada kompleksa tijekom daljnjih 14 ns MD simulacija. Entalpijski doprinosi slobodnoj energiji vezanja izračunati MM_PBSA metodom za dani kompleks nakon 8,5 ns (prije nego je sustav zagrijavan), te nakon 23,6 ns MD simulacija, pokazali su da je zagrijavanjem došlo do povećanje entalpije vezanja (tablica 8).



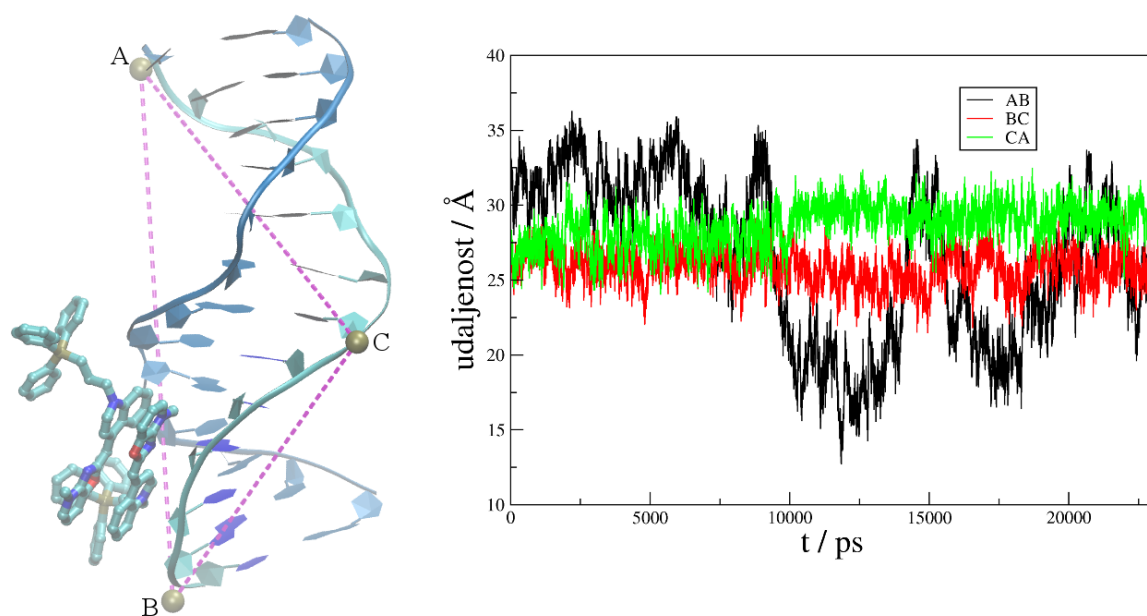
Slika 47. Kompleks dimera spoja **2** vezanog u mali utor ds-DNA. Lijevo je prikazana struktura prije (nakon 8,5 ns MD simulacija), a desno nakon zagrijavanja (nakon 23,6 ns MD simulacija).

Tablica 8. Entalpijski doprinos slobodnoj energiji vezanja izračunat MM_PBSA metodom za kompleks dimera spoja **2** i ds-DNA, nakon 8,5 ns i nakon 23,6 ns MD simulacija.

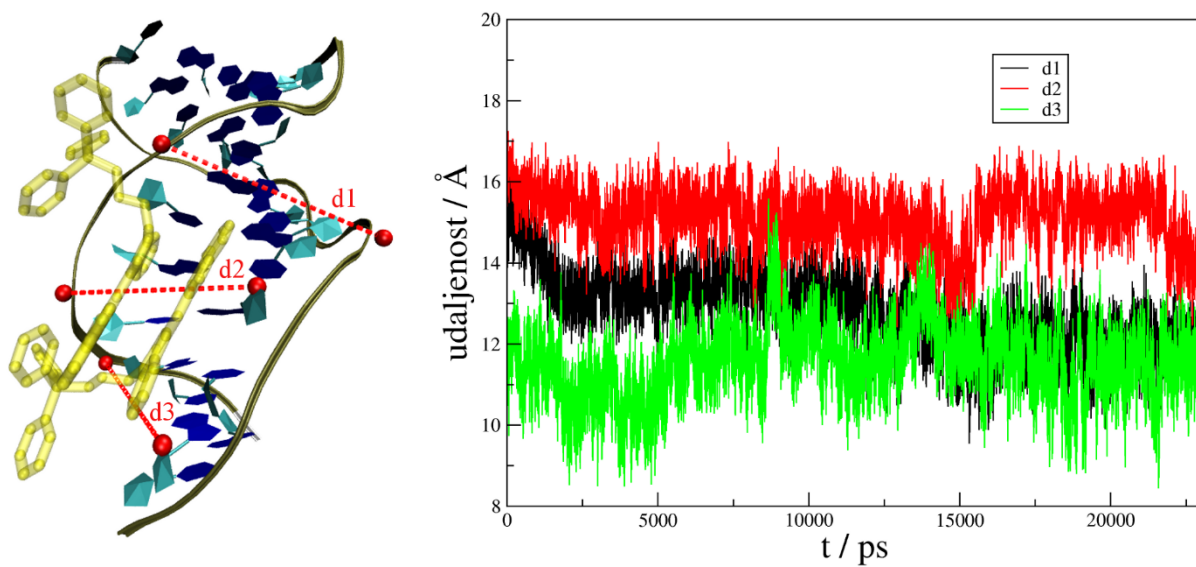
(Objašnjenje pojedinih doprinosa dano je u odjeljku 3.4.3.)

| Energija (kcal/mol) | nakon 8,5 ns MD | nakon 23,6 ns MD |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| ELE | (-1929,7 \pm 33,5) | (-1813,2 \pm 20,3) |
| VDW | (-66,4 \pm 4,1) | (-47,2 \pm 3,0) |
| PBSUR | (-7,8 \pm 0,3) | (-5,9 \pm 0,3) |
| PBSOL | (1937,8 \pm 34,6) | (1819,1 \pm 20,8) |
| PBTOT | (-58,3\pm7,1) | (-41,3\pm4,2) |

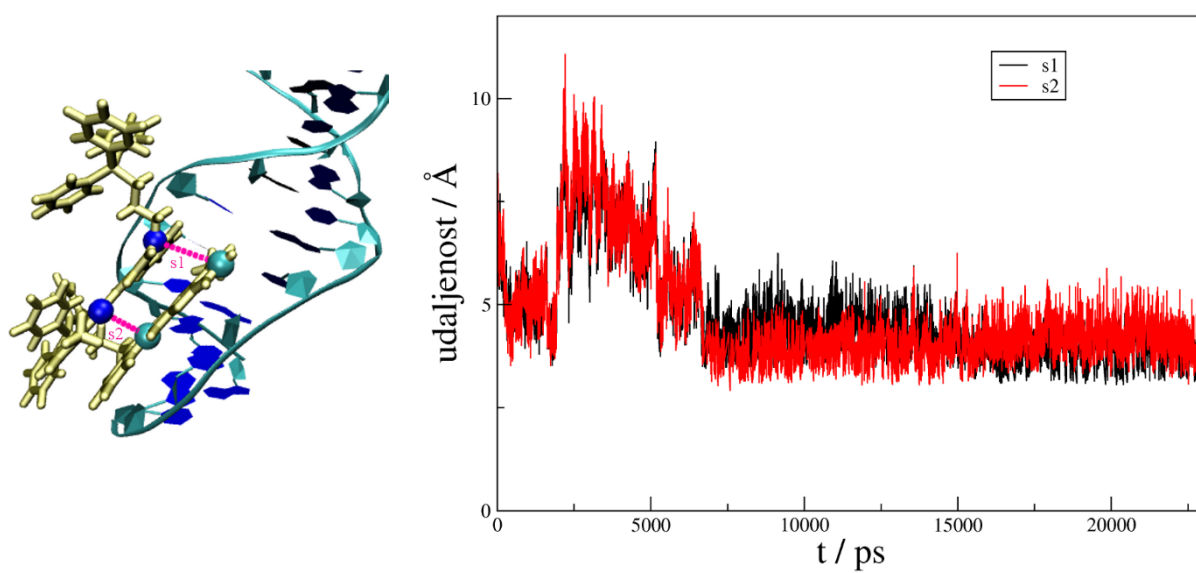
U svrhu detaljnijeg proučavanja promjene geometrije polinukleotida na koji je vezan dimer spoja **2** tijekom MD simulacija, napravljena je analiza geometrije i to praćenjem udaljenosti između tri P atoma označenih slovima A, B i C (slika 48). Dobiveni rezultati pokazuju veću promjenu udaljenosti AB, u odnosu na preostale dvije analizirane udaljenosti, što odgovara savijanju ds-DNA pri čemu ne dolazi do bitnih promjena lokalne strukture, pa ni do značajnije promjene malog utora u koji se vezao dimer spoja **2**. Promjene geometrije malog utora analizirane su praćenjem njegovih širina na različitim položajima (d1-d3) utora (slika 49). Osim malog proširenja, na samom početku simulacija, u svrhu prilagođavanja polinukleotoda strukturi vezanog dimera, nisu primijećene značajnije promjene njegove geometrije. Promjene strukture dimera određene su praćenjem udaljenosti između nasuprotnih atoma, N i C, njegovih dviju podjedinica (s1 i s2), kao što je prikazano na slici 50. Iz grafa (slika 50) vidimo da dimer ostaje u paralelnom slaganju tijekom MD simulacija.



Slika 48. Promjena konformacije polinukleotida tijekom MD simulacija.



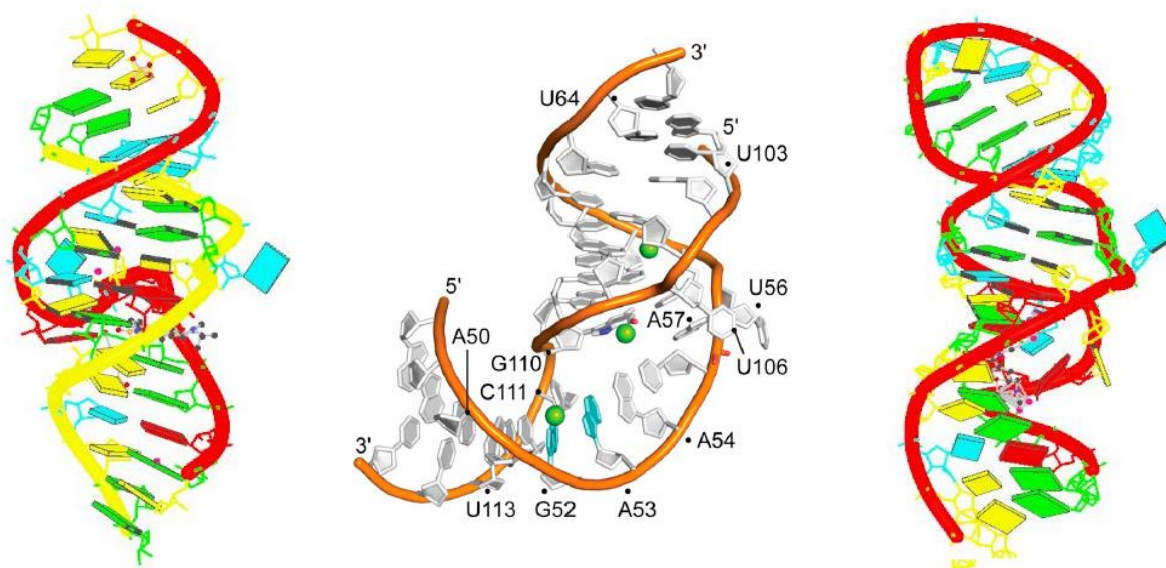
Slika 49. Proširenje malog utora ds-DNA.



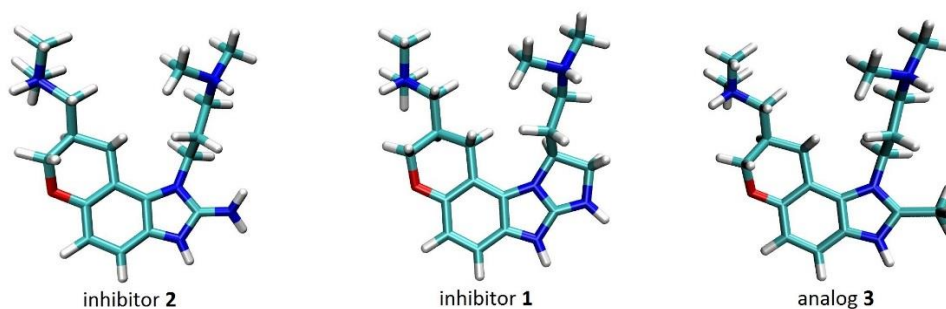
Slika 50. Paralelno slaganje dimera 2.

4.6. Benzimidazolni inhibitori HCV-a

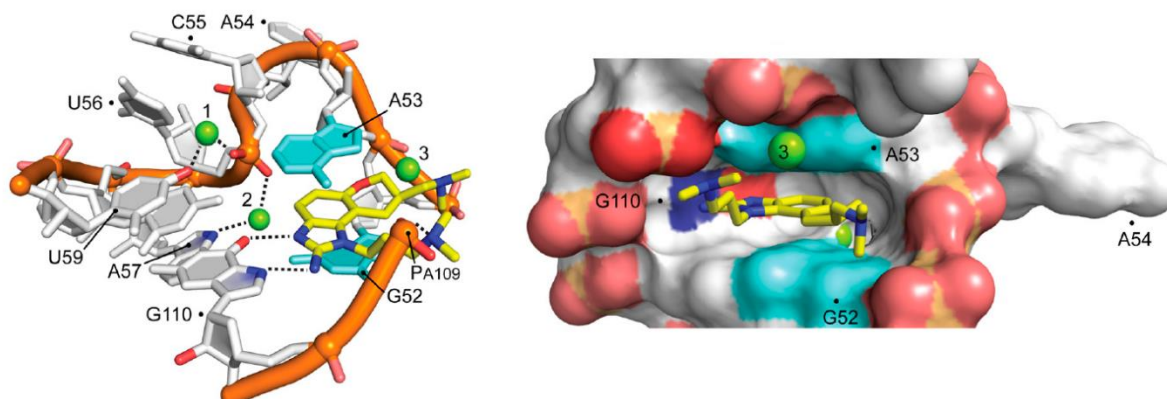
Polazišne točke za molekulsko modeliranje bile su 3D strukture IRES subdomene IIa određene difrakcijom X-zraka (PDB kod 3TZR, 34 nukleotida) [36] i NMR metodom (PDB kod 2KTZ, 38 nukleotida) [37] (slika 51). U obje strukture na danu subdomenu vezan je benzimidazolni translacijski inhibitor **2** (slika 52), za koji se pretpostavlja da replikaciju virusa reducira tako što se veže na IIa [31,104,105]. Smatra se da je L-oblik subdomene IIa (slika 51), sredina) zaslužan za ispravno smještanje virusnog mRNA inicijacijskog kodona na ribosom domaćina, kao i za spajanje ribosomskih podjedinica u funkcionalnu 80S strukturu [33,35]. U veznom mjestu (slika 53), benzimidazolni inhibitor **2** interkaliran je u prostor između adenina A53 i guanina G52, te tvori vodikove veze sa susjednim guaninom G110.



Slika 51. 3D strukture subdomene IIa s vezanim benzimidazolnim translacijskim inhibitorom **2** (lijevo: PDB kod = 3TZR, desno: PDB kod = 2KTZ). U sredini je prikazana subdomena IIa bez vezanog liganda (PDB kod = 2NOK). Preuzeto iz [36,37].



Slika 52. Benzimidazolni inhibitori i analog.



Slika 53. Vezno mjesto benzimidazolnog inhibitora **2** u subdomeni Ila (preuzeto iz [36]).

U radovima Dibrova [36] i Paulsena [37] pokazano je da spojevi koji inhibiraju replikaciju HCV-a uzrokuju izduženje subdomene Ila, čime je pretpostavljen mehanizam djelovanja danih spojeva. Također, autori su uočili bolju stabilizaciju RNA uz prisustvo Mg^{2+} iona (prisutni u 3D strukturi određenoj difrakcijom X-zraka, slika 53).

Polazeći od eksperimentalno određenih struktura kompleksa Ila s benzimidazolnim inhibitorom **2** provedeno je 70 ns MD simulacija u svrhu objašnjenja utjecaja okoline, mutacija i liganda na fleksibilnost i stabilnost 3D RNA strukture. Za utvrđivanje promjena u raspodjeli naboja na ligandima vezanjem za Ila korišten je QM/MM pristup.

4.6.1. Metode molekulskog modeliranja

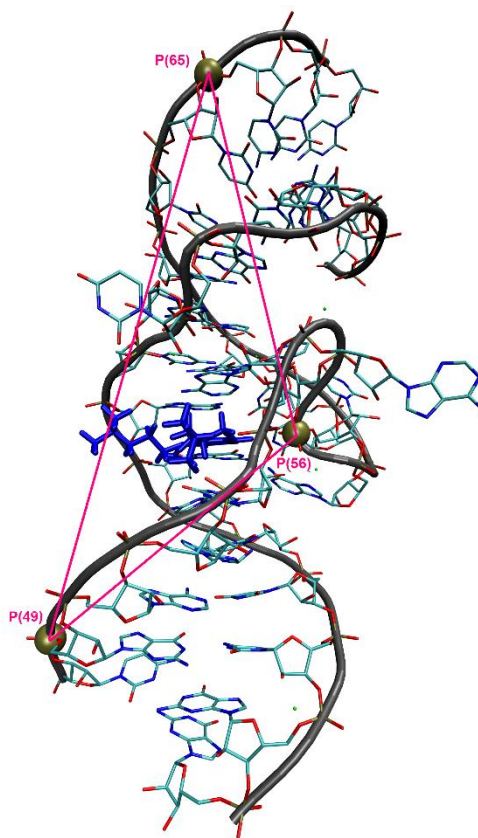
Molekulsko modeliranje provedeno je za kompleks benzimidazolnog translacijskog inhibitora **2** vezanog na IRES subdomenu Ila, čija je 3D struktura određena difrakcijom X-zraka [36]. Uz dani kompleks, simulirani su i kompleksi s inhibitorom **1** i analogom **3** (slika 52), čije su strukture izgrađene koristeći strukturu IRES-a kao predloška na način da je inhibitor **2** zamijenjen s **1**, odnosno **3**. Ligandi su sagrađeni i protonirani korištenjem modula *Builder* unutar programa InsightII [91]. Osim za komplekse, MD simulacije provedene su i za domenu Ila. Prema podacima iz kristalografski određene 3D strukture, guanin G110 vezan je preko vodikovih veza za inhibitor **2**, pa su u svrhu istraživanja važnosti te intrakcije provedene MD simulacije za komplekse mutirane RNA i spoja **2**. Mutant 1 izgrađen je zamjenom Watson-Crick para baza C58-G110 s komplementarnim parom G58-C110, a kod mutanta 2 je isti par baza zamijenjen s U58-A110, čime su narušene vodikove veze s inhibitorom **2**. Parcijalni atomski naboji (ESP) za ligande **1** (dodatak, slika D2, tablica D2), **2** (dodatak, slika D1, tablica D1) i **3** (dodatak, slika D3, tablica D3) određeni su kvantno mehaničkim računima pomoću

programa GAUSSIAN09 [82,106,107] koristeći metodu funkcionala gustoće DFT (B3LYP) i baznog skupa 3-21G.

Za parametrizaciju sustava korištena su GAFF i ff99SB AMBER polja sila. Otapanje, neutralizacija i optimizacija sustava provedena je na način opisan u poglavlju 4.1. Za neutralizaciju su korišteni Na^+ ioni. U većini sustava bili su prisutni i Mg^{2+} ioni koji su uklonjeni samo kada se ispitivao njihov utjecaj na stabilnost određenog sustava. NMR određena struktura ds-RNA simulirana je bez vezanog inhibitora te je taj sustav neutraliziran sa 16 iona Mg^{2+} i jednim ionom Na^+ .

Optimizirani sustavi su uravnoteženi u tri koraka ukupnog trajanja 0,6 ns. U prvom koraku u trajanju od 0,2 ns, temperatura je linearno povećavana s 0 na 100 K, zatim sljedećih 0,2 ns s 100 K na 200 K i posljednjih 0,2 ns s 200 K na 300 K. S uravnoteženim sustavima provedeno je 70 ns produktivnih MD simulacija (detalji o MD simulacijama dani su u poglavlju 4.1.). Geometrijska optimizacija i MD simulacije sustava provedene su korištenjem modula *sander* unutar programskog paketa AMBER12 [51].

Analiza MD trajektorija provedena je programom PTRAJ unutar AMBER12Tools paketa. Savijanje polinukleotidnog lanca praćeno je analizom udaljenosti P atoma iz nukleotida 49 i 65, te kuta određenog s P atomima iz triju nukleotida (49, 56 i 65) jedne polinukleotidne uzvojnice (slika 54), tzv. „3P-kut“.



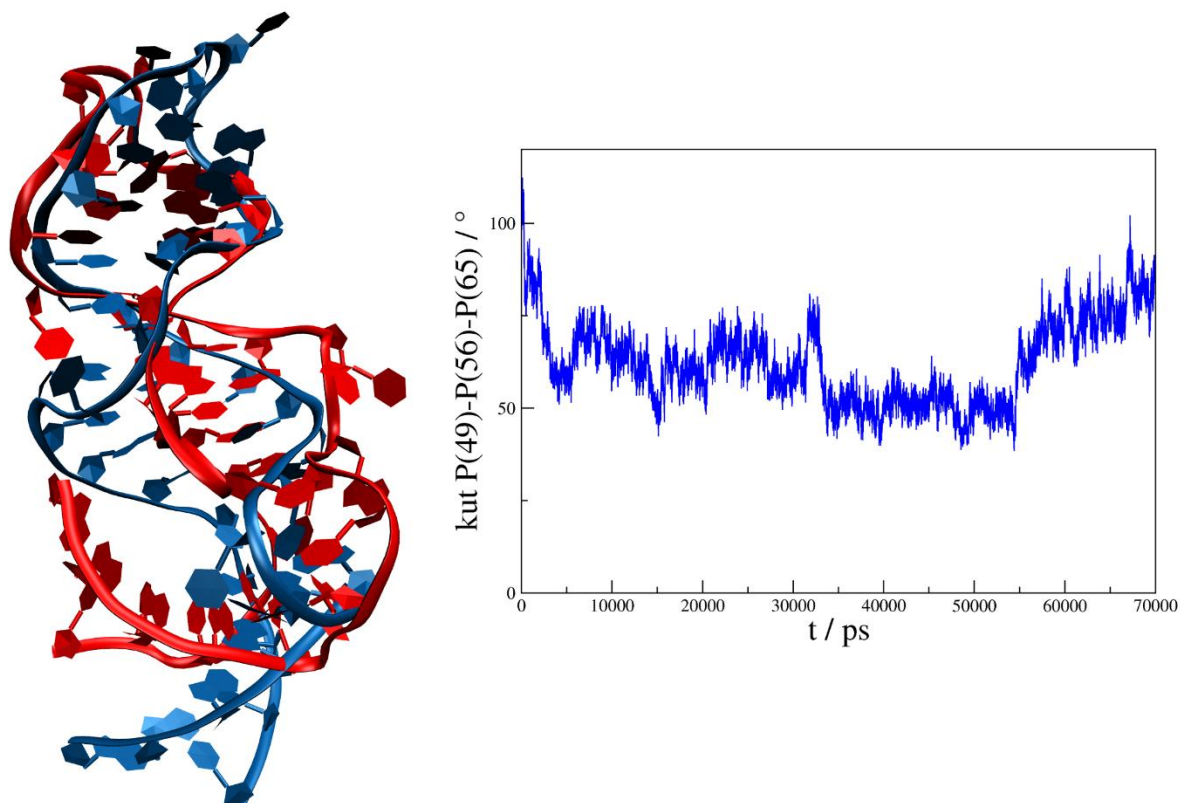
Slika 54. Geometrijska analiza polinukleotida IIa RNA.

4.6.2. Rezultati MD simulacija IRES subdomene IIa bez vezanog liganda

U svrhu proučavanja konformacijske promjene subdomene RNA IIa bez vezanog liganda, korištene su strukture određene dvjema različitim eksperimentalnim tehnikama: difrakcijom X-zraka (PDB kod 3TZR) [36] i NMR-om (PDB kod 2KTZ) [37], iz kojih je uklonjen inhibitor (opisano u metodama 4.6.1.). Obje strukture bez liganda simulirane su uz i bez prisustva Mg^{2+} iona. Tijekom 70 ns MD simulacija, strukture bez vezanog liganda prelazile su u tzv. L-oblik. Za analizu savijanja RNA, praćen je „3P-kut“ (slika 54) tijekom simulacija. U slučaju strukture IIa određene difrakcijom X-zraka, „3P-kut“ se tijekom simulacija smanjio za otprilike 30 stupnjeva.

Konformacija NMR-om određene strukture IIa, neutralizirana Mg^{2+} ionima, promijenila se tijekom MD simulacija iz izduženog u vrlo savijeni oblik. L-oblik je u najvećoj mjeri poprimila nakon otprilike 46 ns MD simulacija, kada se „3P-kut“ smanjio za približno 66 stupnjeva (slika 55). Tijekom naknadnih simulacija, polinukleotid je poprimio nešto izduženiji oblik te je nakon 70 ns „3P-kut“ bio za otprilike 30 stupnjeva manji nego u početnoj strukturi. Usprkos stvorenoj šupljini na mjestu vezanja liganda i promjeni strukture polinukleotida tijekom MD simulacija, magnezijevi ioni smješteni u blizini baza G33, A6 i G5 (slika 53) tek su neznatno promijenili svoje položaje (dodatak, slike D4 i D5).

Računima slobodne energije, pomoću MM_PBSA metode, pokazano je da se konformacijska entalpija smanjuje prilikom savijanja RNA. Slobodna energija konformacije IIa nakon prelaska u L-oblik niža je za približno 36 kcal/mol (tablica 9).



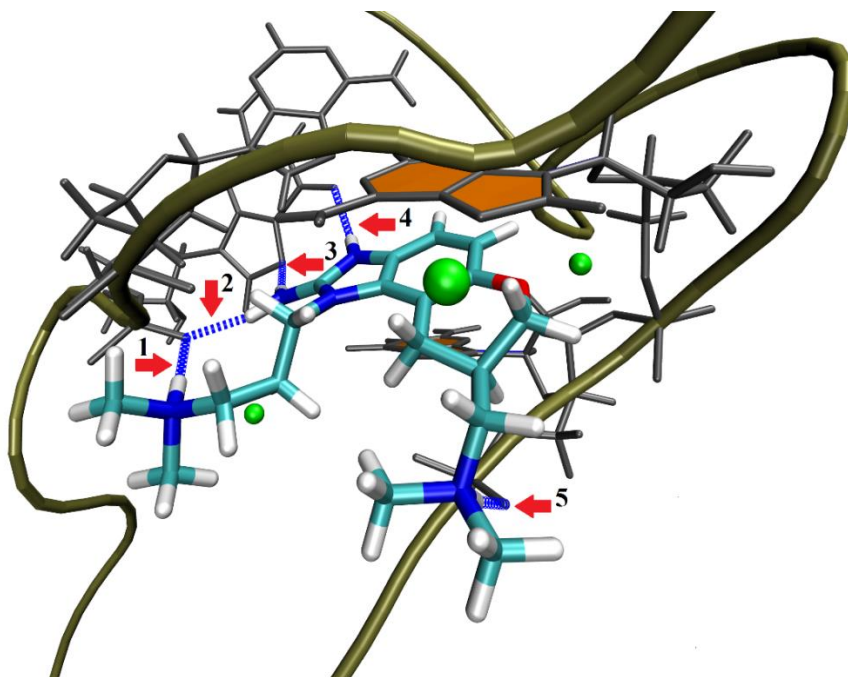
Slika 55. Lijevo: plavom bojom prikazana je početna konformacija IRES subdomene IIa određene NMR-om, dok je crvenom prikazana njezina konformacija nakon 46 ns MD simulacija, kada je u najvećoj mjeri poprimila L-oblik. Desno: prikaz promjene "3P-kuta" tijekom MD simulacija.

Tablica 9. Entalpijski doprinos slobodnoj energiji vezanja izračunat za IIa RNA (početna struktura određena NMR metodom) bez vezanog liganda, prije savijanja (za period između 4. i 6. ns MD simulacija) i nakon poprimanja L-oblika (nakon 70 ns MD simulacija). Simulacije su provedene uz prisustvo magnezijevih iona. (Objašnjenje pojedinog doprinosa dano je u odjeljku 3.1.5.)

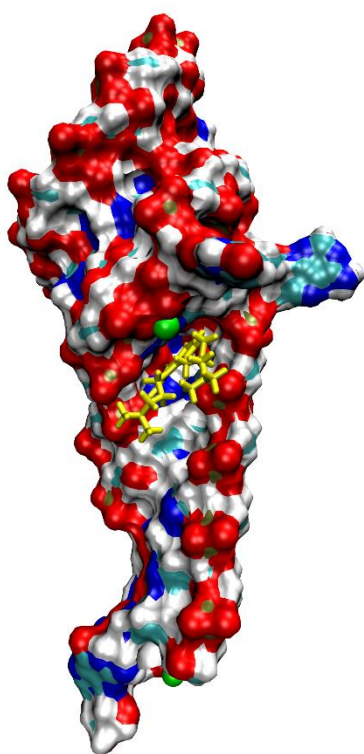
| Energija (kcal/mol) | IIa (NMR) prije savijanja | IIa (NMR) u L-obliku, nakon 70 ns MD |
|---------------------|------------------------------|---|
| ELE | (-13855,8±65,1) | (-13810,3±50,7) |
| VDW | (-142,2±17,2) | (-142,3±16,6) |
| PBSUR | (-51,1±0,8) | (-52,0±0,6) |
| PBSOL | (-4186,5±69,1) | (-4261,9±52,6) |
| PBTOT | (-16114,1±33,9) | (-16150,8±32,0) |

4.6.3. Rezultati MD simulacija kompleksa s IRES subdomenom IIa

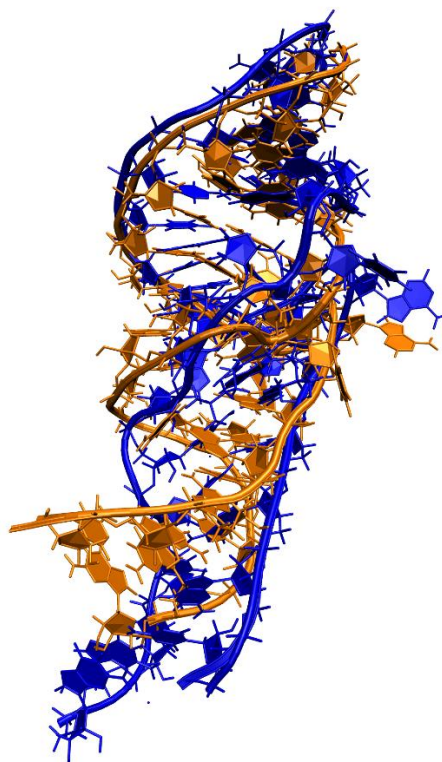
Kako bi detaljno analizirali stabilnost kompleksa i interakcije između IRES subdomene IIa i dvaju benzimidazolnih inhibitora **2** i **1** te analoga **3** (slika 52), kao i dvaju mutanta RNA i inhibitora **2**, provedeno je 70 ns MD simulacija. Polazišna točka bila je 3D struktura subdomene IIa s vezanim benzimidazolnim HCV inhibitorom **2**, određena difrakcijom X-zraka (PDB kod 3TZR) [36]. Prije provođenja MD simulacija, kompleksi su otopljeni u vodi i optimizirani (opisano u metodama 4.6.1.). Provedeno je 70 ns MD simulacija na sobnoj temperaturi. Analiza rezultata pokazala je da je najstabilniji kompleks s vezanim inhibitorom **2**, što je u skladu s eksperimentalnim istraživanjima [36]. U slučaju kompleksa s nativnom RNA benzimidazolni inhibitor ostao je u potpunosti interkaliran u prostoru između susjednih baza guanina G52 i adenina A53 (slika 56). Tijekom MD simulacija došlo je do daljnjeg izduživanja subdomene IIa (slike 57 i 58), te se „3P-kut“ povećao za oko 10 stupnjeva (slika 59).



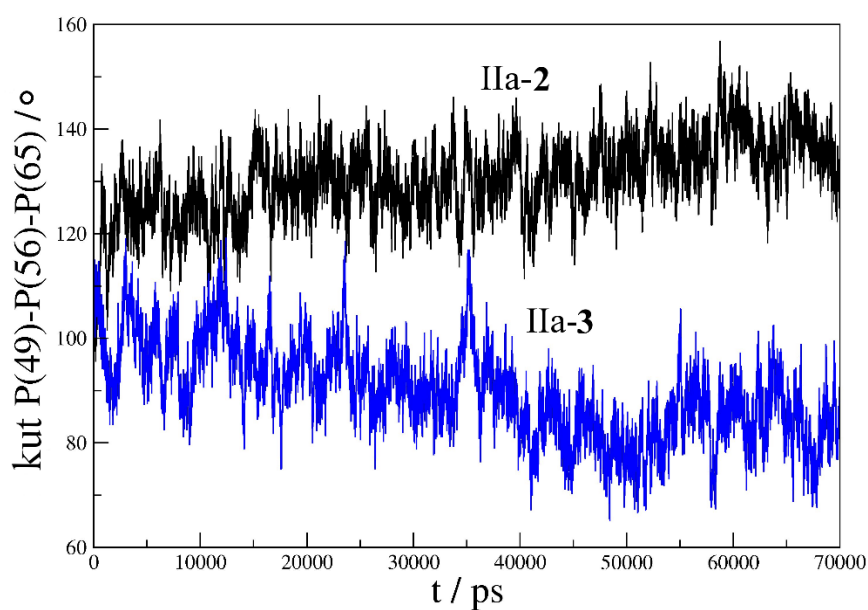
Slika 56. Vezno mjesto liganda. Rezultat nakon 70 ns MD simulacija. Inhibitor **2** interkaliran je između dviju baza (iznad njega je adenin A53, a ispod je guanin G52, obje baze obojane su narančasto). Mg^{2+} ioni prikazani su zelenom bojom. Vodikove veze prikazane su crtkanim, plavim linijama, a na njih dodatno ukazuju crvene strelice, te su ostvarene redom između sljedećih atoma: 1) HN(**2**)-O2P(G110), 2) H031(**2**)-O2P(G110), 3) H032(**2**)-N7(G110), 4) H01(**2**)-O6(G110) i 5) H04(**2**)-O1P(G52).



Slika 57. Konačna (nakon 70 ns MD), optimizirana struktura kompleksa Ila-2. Inhibitor 2 prikazan je žutom bojom.



Slika 58. Rezultati konačnih, optimiziranih struktura dobivenih nakon 70 ns MD simulacija. Plavo: subdomena Ila iz kompleksa Ila-2. Narančasto: subdomena Ila modelirana bez vezanog inhibitora (početna struktura određena difrakcijom X-zraka).

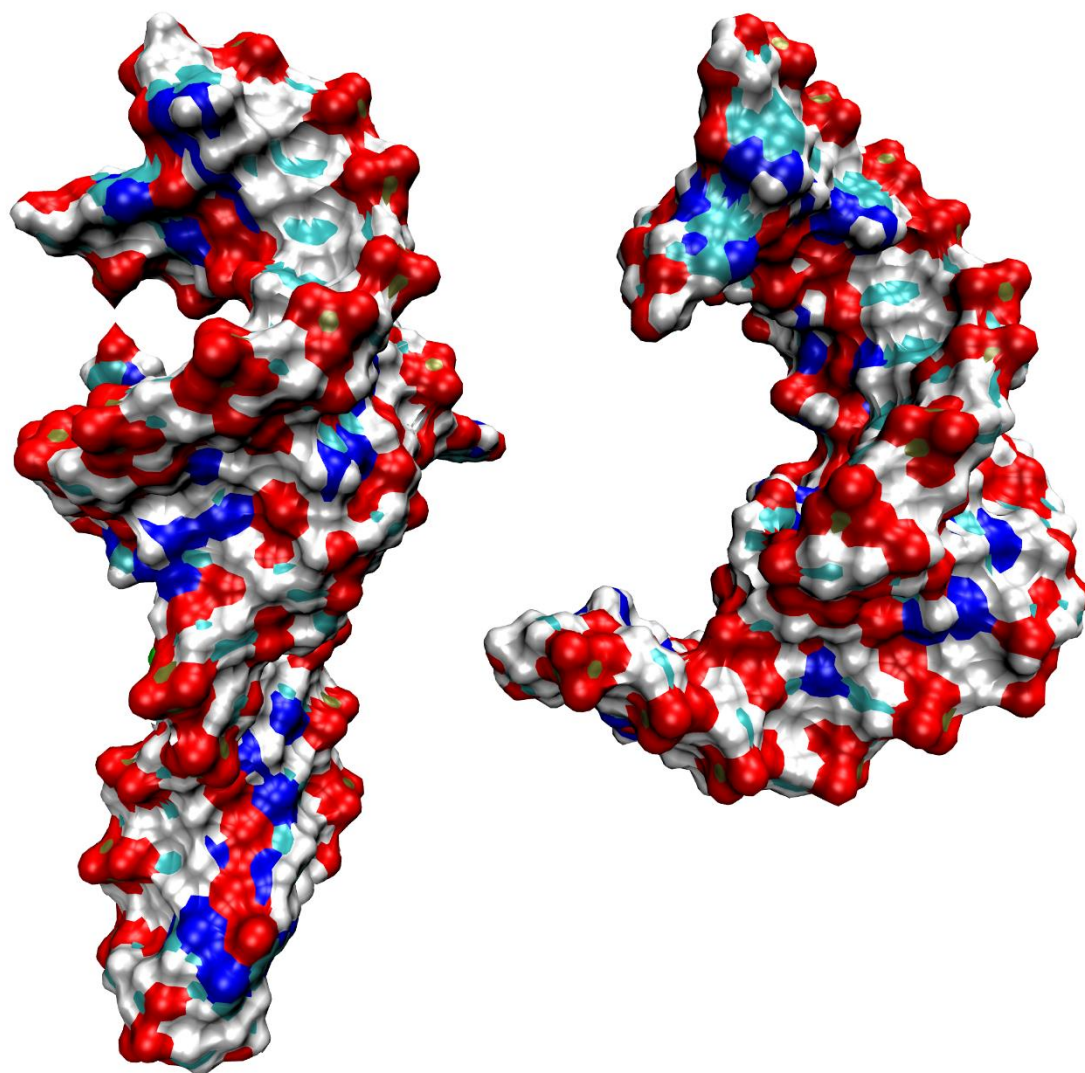


Slika 59. Usporedba promjene "3P-kuta" tijekom MD simulacija za komplekse subdomene Ila i inhibitora 2 (crno), tj. analoga 3 (plavo).

U konačnoj, optimiziranoj strukturi, nakon 70 ns MD simulacija, prisutno je pet vodikovih veza koje značajno stabiliziraju dani sustav (slika 56). Dvije su formirane između NH_2 grupe benzimidazolnog inhibitora **2** i susjednog guanina G110, odnosno susjedne fosfatne grupe. Ista fosfatna grupa povezana je vodikovom vezom s protoniranim dimetilamino-propil lancem liganda. Četvrta vodikova veza povezuje NH^+ grupu iz benzimidazolnog prstena spoja **2** i karbonilni kisik iz susjednog G110, a peta drugi protonirani dimetilamino-propil lanac liganda **2** i susjednu fosfatnu skupinu iz nukleotida 52. Tijekom simulacija, tri magnezijeva iona (slika 56) ostala su u veznom mjestu liganda što je doprinijelo stabilnosti sustava (kompleksa). Iz izračunatih slobodnih energija vezanja (tablica 10) za komplekse proizlazi da je sustav s inhibitorom **2** najstabilniji. Kompleks s analogom **3** je najnestabilniji (kod analoga **3** nalazimo metilnu skupinu umjesto NH_2 grupe). Slobodna energija vezanja (entalpijski doprinos) za kompleks s inhibitorom **2** je za približno 15 kcal/mol niža od energije za kompleks s analogom **3**. Dani rezultat može se povezati i sa samom konformacijom L-oblika koju je poprimio kompleks s analogom **3** tijekom simulacija (slika 60). Možemo zaključiti da analog **3** nije odgovarajući inhibitor za Ila metu, što je u skladu s eksperimentalnim podacima [36].

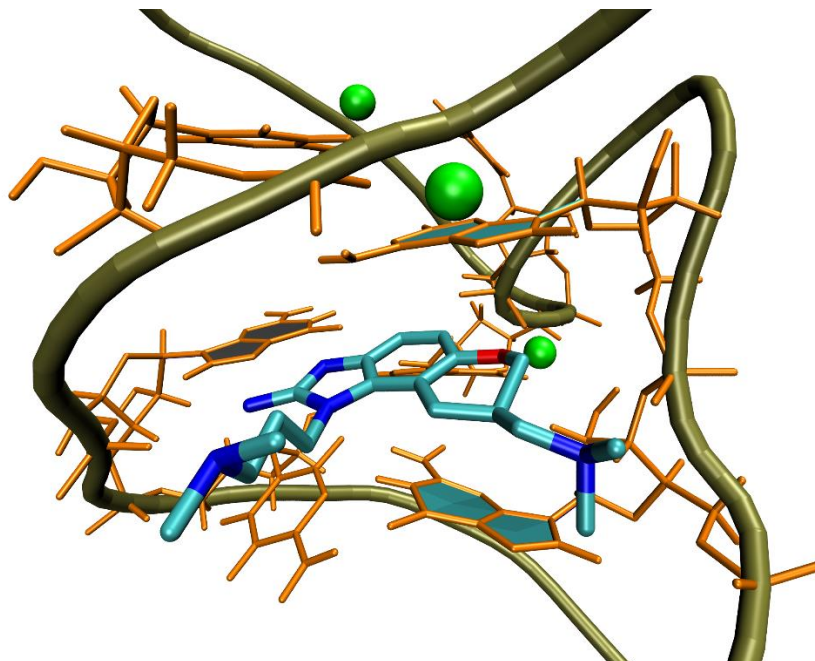
Tablica 10. Entalpijski doprinos slobodnoj energiji vezanja izračunat MM_PBSA metodom za komplekse nakon 70 ns MD simulacija. (Objašnjenje pojedinog doprinosa dano je u odjeljku 3.1.5.)

| Energija (kcal/mol) | Ila - inhibitor 2 | Ila – inhibitor 1 | Ila – analog 3 | mutant 1 – inhibitor 2 | mutant 2 – inhibitor 2 |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| ELE | (-1508,5±19,0) | (-1482,8±30,1) | (-1431,9±28,0) | (-1437,2±18,3) | (-1461,2±18,8) |
| VDW | (-42,6±3,3) | (-43,2±2,3) | (-31,9±2,6) | (-45,2±2,7) | (-47,2±3,0) |
| PBSUR | (-4,8±0,2) | (-4,8±0,2) | (-4,1±0,2) | (-4,8±0,1) | (-5,4±0,1) |
| PBSOL | (1501,1±16,5) | (1479,5±28,4) | (1428,7±27,1) | (1449,5±18,0) | (1473,4±20,1) |
| PBTOT | (-50,0±8,6) | (-46,5±6,6) | (-35,2±5,4) | (-32,9±6,7) | (-35,0±8,9) |

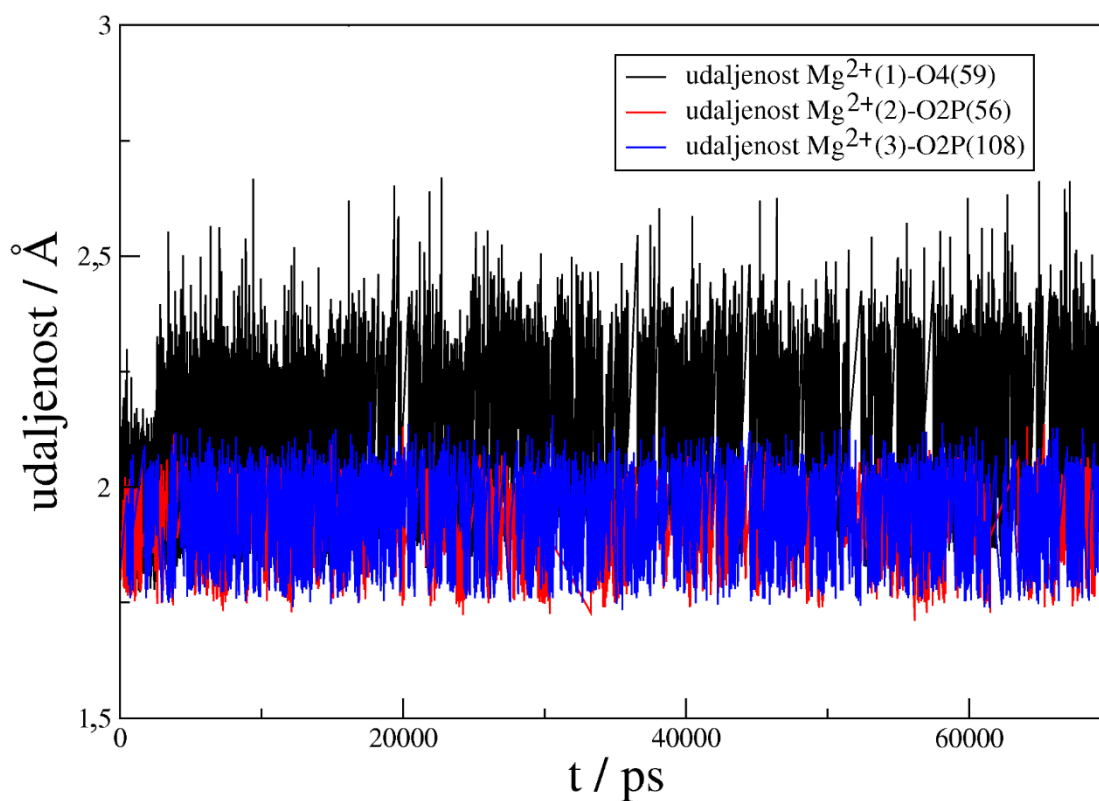


Slika 60. Lijevo: istegnuti oblik subdomene IIa iz kompleksa s inhibitorom **2**. Desno: L-oblik IIa iz kompleksa s analogom **3**.

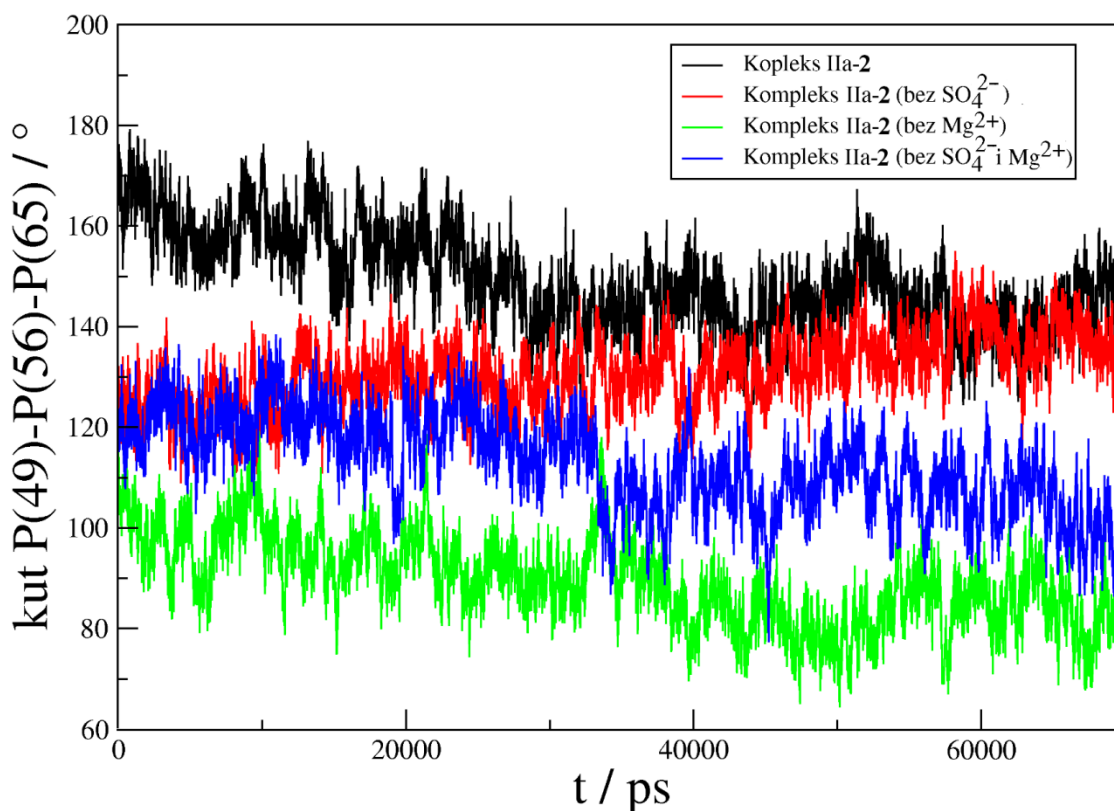
U eksperimentalnim istraživanjima [36] je zaključeno da magnezijevi ioni značajno stabiliziraju sustav. U ovom radu provedena je analiza njihove udaljenosti do najbližih susjednih atoma čime se htjelo vidjeti ostaju li u veznom mjestu (slika 61). Analiza je provedena programom PTRAJ unutar AMBERToolsa [50]. Dobiveni rezultati (slika 62) pokazali su da tijekom čitavih simulacija Mg^{2+} ioni ostaju u veznom mjestu. Također, tijekom simulacija bez prisustva Mg^{2+} , došlo je do, za aktivnost HCV RNA, povoljnog savijanja strukture IIa (slika 63).



Slika 61. Magnezijevi ioni (prikazani zelenom bojom) u veznom mjestu liganda (kompleks IIa – inhibitor 2).



Slika 62. Analiza udaljenosti magnezijevih iona od susjednih atoma (svi atomi navedeni su u legendi grafa) u kompleksu IIa-inhibitor 2.

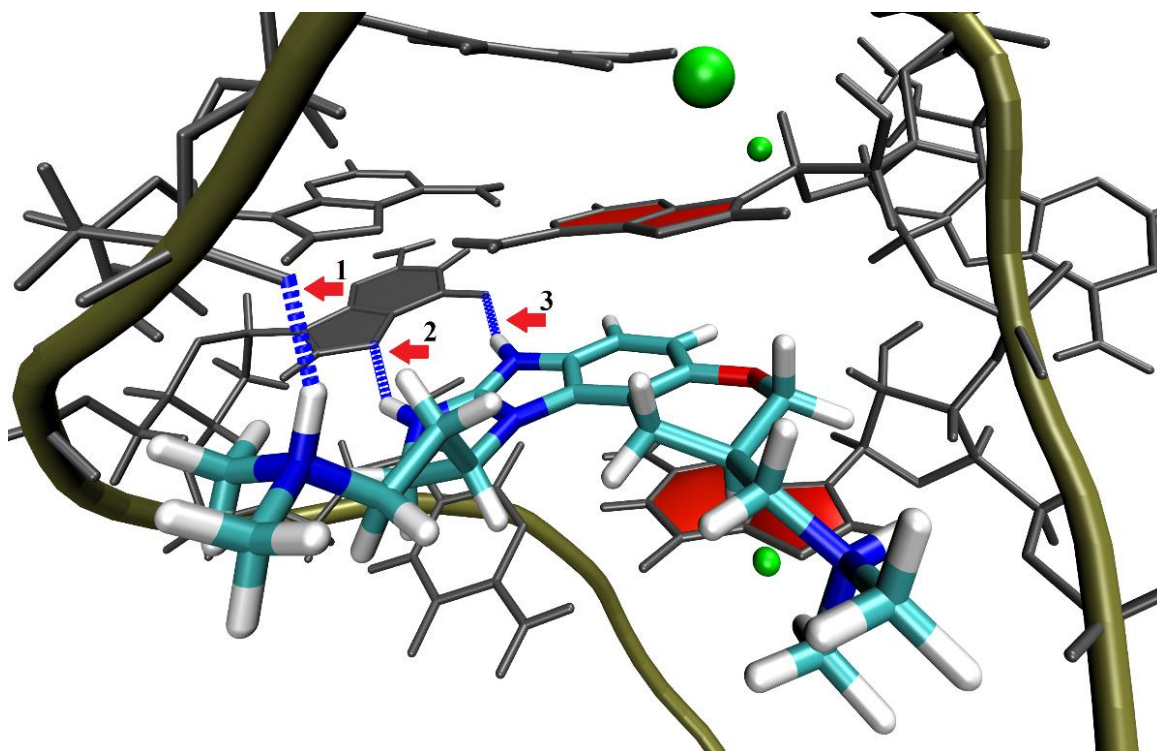


Slika 63. Analiza "3P-kuta" za kompleks Ila-**2** u različitim okolišima.

Molekulsko modeliranje provedeno je i za kompleks subdomene Ila s inhibitorom **1** za koji ne postoji eksperimentalno određena struktura. Početna konformacija izgrađena je iz poznate strukture kompleksa s vezanim inhibitorom **2**, zamjenom liganada (isti postupak korišten je i za kompleks s analogom **3**). Tijekom MD simulacija, spoj **1** ostao je u potpunosti interkaliran u dano vezno mjesto liganda u subdomeni Ila i stvorene su tri intermolekulske vodikove veze koje pospješuju stabilizaciju kompleksa (slika 64). Jedna vodikova veza ostvarena je između protonirane dimetilamino-propilnog lanca liganda **1** i susjedne fosfatne grupe, dok su druge dvije ostvarene sa susjednom bazom G110. Slobodna energija vezanja (tablica 10) za dani kompleks je nešto viša nego za kompleks s inhibitorom **2** (za približno 4 kcal/mol) ali još uvijek znatno niža nego za kompleks s analogom.

Kompleksi benzimidazalnog inhibitora **2** i mutanta 1 i 2 sagrađeni su zamjenom susjednog guanina G110 s citozinom odnosno adeninom, prilikom čega je sačuvano njihovo Watson-Crick sparivanje sa susjednim parom baza (pri tome je kod mutanta 1 susjedni citozin C58, s kojim je bio povezan guanin G110, zamijenjen guaninom G58, a u slučaju mutanta 2 s uracilom U58). Vodikove veze sa susjednim guaninom G110 imaju ključnu ulogu u vezanju

liganda **2** [36] (slika 56). Te dvije veze sačuvane su u danom kompleksu tijekom MD simulacija. U kompleksima s mutantima vodikove veze ključne za stabilizaciju liganda ne postoje. Također, slobodne energije vezanja su znatno više (nepovoljnije) u odnosu na kompleks IIa – inhibitor **2** (tablica 10).



Slika 64. Vezno mjesto liganda u kompleksu IIa-1. Inhibitor **1** interkaliran je između dviju baza; s njegove gornje strane nalazi se adenin A53, a s donje guanin G52 (prikazani crveno). Plavim crtkanim linijama prikazane su tri intermolekulske vodikove veze (na njih ukazuju crvene strelice) ostvarene između sljedećih atoma: 1) HN(**2**)-O2P(A109), 2) 3HN0(**2**)-N7(G110) i 3) H01(**2**)-O6(G110).

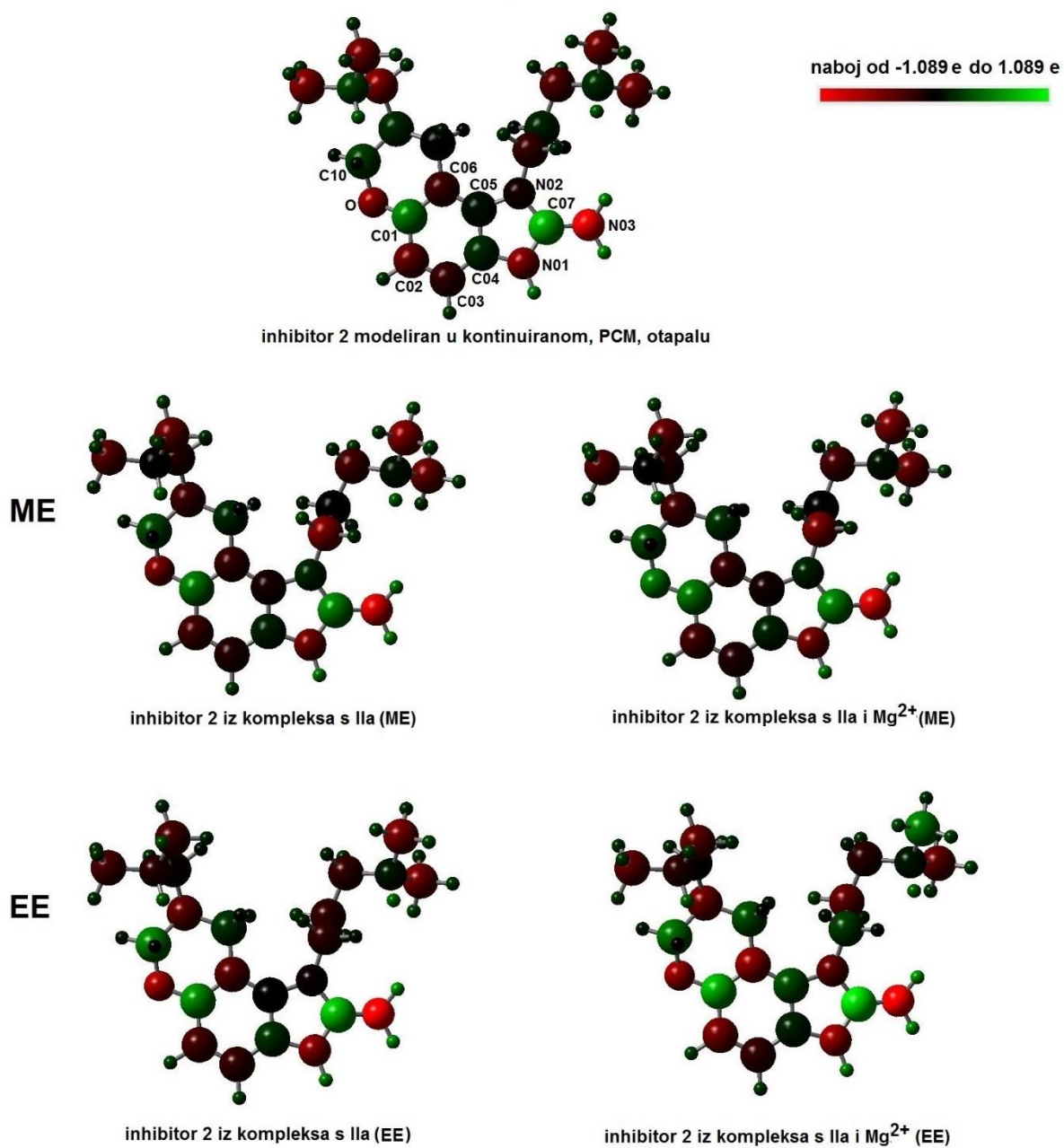
4.6.4. QM/MM pristup

Prije samih *ab initio* računa, za početnu procjenu geometrije molekula/kompleksa proveden je semiempirijski PM6 račun [81].

Kombinirani QM/MM pristup korišten je za utvrđivanje promjena u raspodjeli naboja na ligandima **2** i **3** prilikom vezanja na IRES subdomenu Ila. Za same ligande provedeni su kvantno mehanički računi uz prisustvo polarizabilnog kontinuuma PCM [79], kojim je simulirano otapalo, pri čemu je korištena dielektrična konstanta $\epsilon = 78,39$.

U svrhu izvedbe QM/MM računa korištena je subtraktivna, dvoslojna ONIOM metoda [88], unutar programa GAUSSIAN [82]. U slučaju kompleksa, kod provedenih QM/MM računa ligand je predstavljao „QM“ dio, dok je ostatak sustava („MM“ dio) tretiran empirijski korištenjem AMBER polja sila ff99 [89]. QM/MM računi provedeni su u plinskoj fazi, te uz i bez prisustva Mg^{2+} iona (tretirani kao „MM“ dio) kako bi se ispitao njihov utjecaj na polarizaciju, tj. raspodjelu naboja na ligandu. Za „QM“ dio korišten je funkcional DFT (B3LYP) s baznim skupom 6-31G. Elektrostatske interakcije između „QM“ i „MM“ dijela razmatrane su na dva načina: mehaničkim uklapanjem, ME, i elektrostatskim uklapanjem, EE, (opisano u poglavlju 3.3.).

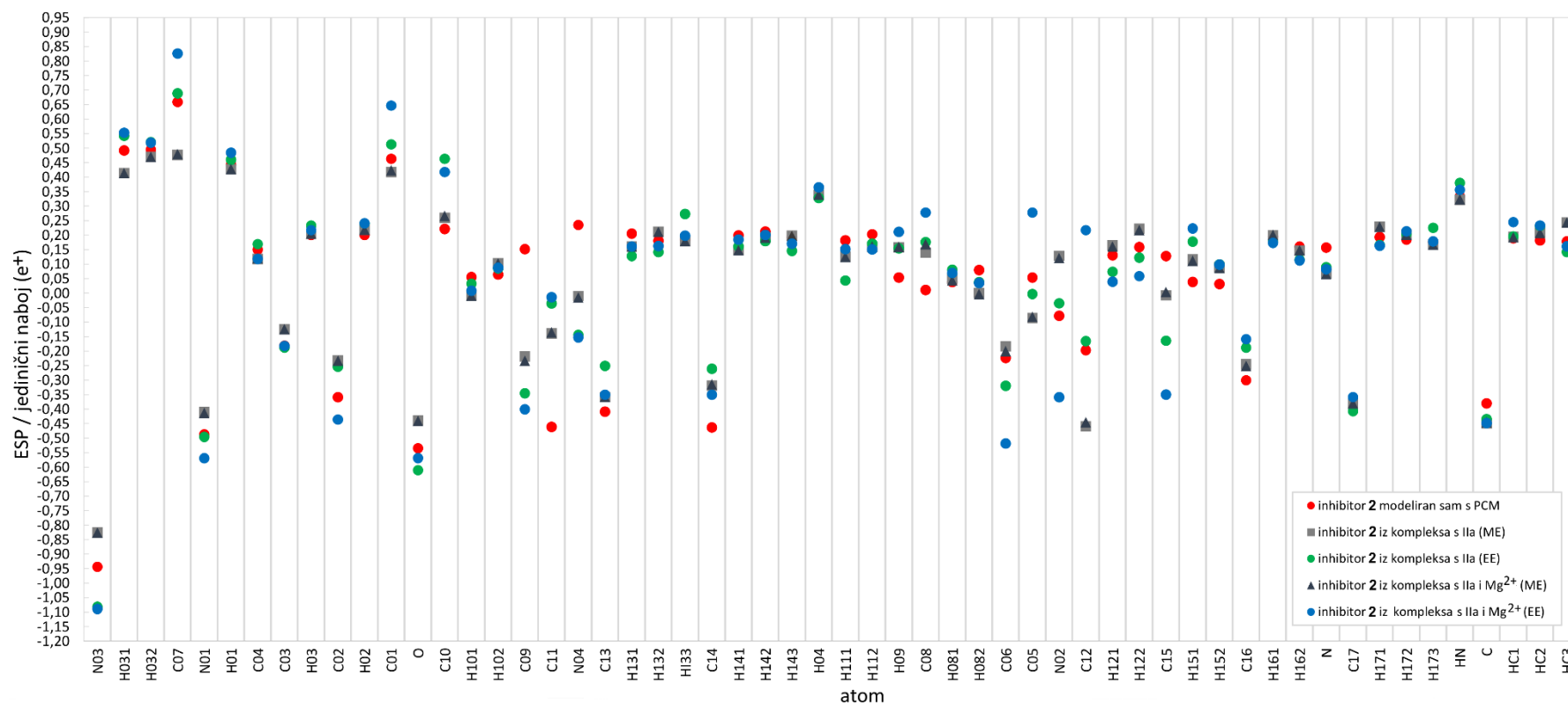
Prikaz ESP naboja za sve slučajeve (ME i EE te s i bez Mg^{2+} iona) dan je na slici 65. ESP i Mulliken naboji dobiveni QM i QM/MM računima za atome inhibitora **2** na kojima je došlo do najveće promjene naboja prikazani su u tablici 11 (rezultati za ESP naboje za sve atome dani su u dodatku u tablici D4). Grafički prikaz promjene raspodjele naboja na svim atomima dan je na slici 66. Atomi na kojima dolazi do najvećih promjena nalaze se na onom dijelu inhibitora koji je najviše interkaliran u Ila što upućuje na utjecaj okoline na samu raspodjelu. Također, na raspodjelu znatno utječu i Mg^{2+} ioni. Kod EE pristupa u QM/MM računu uočavamo veće promjene u raspodjeli naboja, tj. jaču polarizaciju jer se u tom pristupu parcijalni naboji iz „MM“ sloja ugrađuju u kvantno mehanički Hamiltonijan čime su bolje opisane elektrostatske interakcije „QM“ i „MM“ područja. U ME pristupu atomi iz „MM“ dijela na „QM“ dio utječu isključivo sterički, a elektrostatske interakcije između tih dijelova sustava računaju se MM metodom (empirijski). ESP naboji izračunati za analog dani su u dodatku (tablica D5 i slika D6).



Slika 65. Prikaz raspodjele naboja na atomima inhibitora **2** modeliranom u različitim okolišima. Prikazana su imena atoma na kojima dolazi do najveće promjene naboja.

Tablica 11. ESP naboji određeni za inhibitor **2**: QM računom za inhibitor **2** modeliran u kontinuiranom otapalu (PCM), te QM/MM računom, uz ME i EE uklapanje, za inhibitor **2** u kompleksu s Ila, s i bez Mg^{2+} iona. Prikazani su jedinični naboji (e^+) za atome inhibitora na kojima je uslijed vezanja za RNA došlo do najveće promjene .

| ESP naboji / jedinični naboj (e^+) | | | | | |
|---|--|--|--|---|---|
| atom | inhibitor 2 modeliran s PCM | inhibitor 2 iz kompleksa s Ila (ME) | inhibitor 2 iz kompleksa s Ila (EE) | inhibitor 2 iz kompleksa s Ila, s Mg^{2+} (ME) | inhibitor 2 iz kompleksa s Ila, s Mg^{2+} (EE) |
| N03 | -0,943501 | -0,825192 | -1,081520 | -0,825720 | -1,088693 |
| C07 | 0,659518 | 0,477065 | 0,688863 | 0,479722 | 0,826527 |
| N01 | -0,486684 | -0,409576 | -0,495454 | -0,413106 | -0,568959 |
| C04 | 0,150322 | 0,118241 | 0,169494 | 0,120637 | 0,118259 |
| C03 | -0,180582 | -0,123953 | -0,187042 | -0,124647 | -0,182002 |
| C02 | -0,358560 | -0,231708 | -0,253760 | -0,232459 | -0,435475 |
| C01 | 0,463289 | 0,418108 | 0,513515 | 0,423874 | 0,646930 |
| O | -0,534578 | -0,438181 | -0,610063 | -0,440900 | -0,568331 |
| C10 | 0,221707 | 0,260110 | 0,463490 | 0,267303 | 0,418322 |
| C06 | -0,222840 | -0,183388 | -0,319342 | -0,199528 | -0,518463 |
| C05 | 0,054109 | -0,085509 | -0,002646 | -0,080919 | 0,278211 |
| N02 | -0,078135 | 0,129265 | -0,034917 | 0,121348 | -0,358774 |
| Mulliken naboji / jedinični naboj (e^+) | | | | | |
| N03 | -0,729676 | -0,694341 | -0,822907 | -0,693754 | -0,820635 |
| C07 | 0,864333 | 0,843674 | 0,884792 | 0,843117 | 0,878753 |
| N01 | -0,765576 | -0,760912 | -0,758031 | -0,760663 | -0,767277 |
| C04 | 0,293375 | 0,297661 | 0,308973 | 0,297141 | 0,310629 |
| C03 | -0,079829 | -0,071772 | -0,107447 | -0,071628 | -0,108495 |
| C02 | -0,157854 | -0,104766 | -0,119774 | -0,105052 | -0,193291 |
| C01 | 0,237317 | 0,181474 | 0,199440 | 0,181615 | 0,204529 |
| O | -0,587325 | -0,496786 | -0,554072 | -0,496755 | -0,536317 |
| C10 | -0,016246 | -0,072240 | -0,091405 | -0,072507 | -0,048855 |
| C06 | 0,209950 | 0,222928 | 0,215813 | 0,222999 | 0,218037 |
| C05 | 0,239175 | 0,209515 | 0,221531 | 0,209862 | 0,218776 |
| N02 | -0,739196 | -0,720642 | -0,746359 | -0,720729 | -0,717238 |



Slika 66. Prikaz raspodjele ESP naboja za sve atome inhibitora **2**. Naboji su određeni QM i QM/MM računima za razne uvjete (bez i s Mg^{2+} ionima) te korištenjem ME i EE uklapanja.

Dobivene ONIOM energije za komplekse inhibitora **2** i analoga **3** s Ila, prikazane u tablici 12, upućuju na veću stabilnost kompleksa s inhibitorom **2**, što je u skladu s eksperimentalnim rezultatima. Nadalje, energija je povoljnija (niža) u slučaju prisutnih Mg^{2+} iona u sustavu, što je također u skladu s eksperimentalnim pretpostavkama prema kojima dani ioni pridonose stabilnosti sustava. Niže energije dobivene su i EE pristupom što je posljedica veće polarizacije od strane „MM“ dijela.

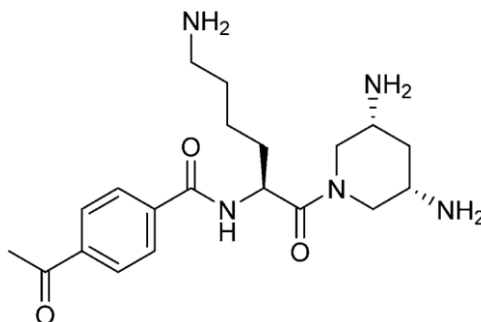
Tablica 12. ONIOM energije za komplekse RNA (subdomene Ila) s inhibitorom **2** i analogom **3**, bez i s Mg^{2+} ionima u sustavima.

| | $E^{\text{ONIOM}} / (\text{kcal/mol})$ | | | |
|-----------|--|---|-----------------------|--|
| | Ila – inh 2 | Ila - inh 2 , s Mg^{2+} | Ila - analog 3 | Ila - analog 3 , s Mg^{2+} |
| ME | -658447,9 | -666645,6 | -648291,3 | -654405,6 |
| EE | -658462,7 | -666684,7 | -648294,1 | -654409,4 |

4.7. Diaminopiperidinski translacijski inhibitor (DAP) HCV-a

Diaminopiperidin DAP (slika 67) novo je sintetizirani spoj koji se veže kao ligand za subdomenu Ila (opisano u prethodnom poglavlju). Eksperimentalna istraživanja temeljena su na fluorescentnoj probi koristeći RNA metu u kojoj je baza A54 zamijenjena fluorescentnim 2-aminopurinom (2AP) baznim analogom [39,108]. Na temelju dobivenih rezultata pretpostavljeno je da takvi ligandi (DAP) stabiliziraju savijeni oblik RNA, što je suprotno djelovanju benzimidazolnih inhibitora. Savijeni oblik Ila ima ključnu ulogu za ispravno smještanje domene IIb na E-stranu ribosoma. Prilikom savijanja došlo je do pada fluorescencije što je rezultat aromatskog slaganja, spomenutog, fluorescentnog analoga između susjednih baza u RNA.

Kao što je opisano u prethodnom poglavlju, subdomena Ila HCV RNA poprima L-oblik, stabiliziran Mg^{2+} ionima, potreban za ispravno pozicioniranje domene IRES na ribosom. Otpuštanje ribosoma nakon translacije može uključivati dinamičke promjene u L-obliku strukture RNA, tj. izmjene izduženog i savijenog oblika. Benzimidazolni inhibitori vezati će se na izduženi oblik Ila te tako narušiti IRES funkciju i inhibirati sintezu virusnog proteina [31]. U tom pretpostavljenom modelu DAP derivat „zaključava“ Ila RNA u savijenoj konformaciji te najvjerojatnije inhibira IRES na način da se spriječi otpuštanje ribosoma [39].



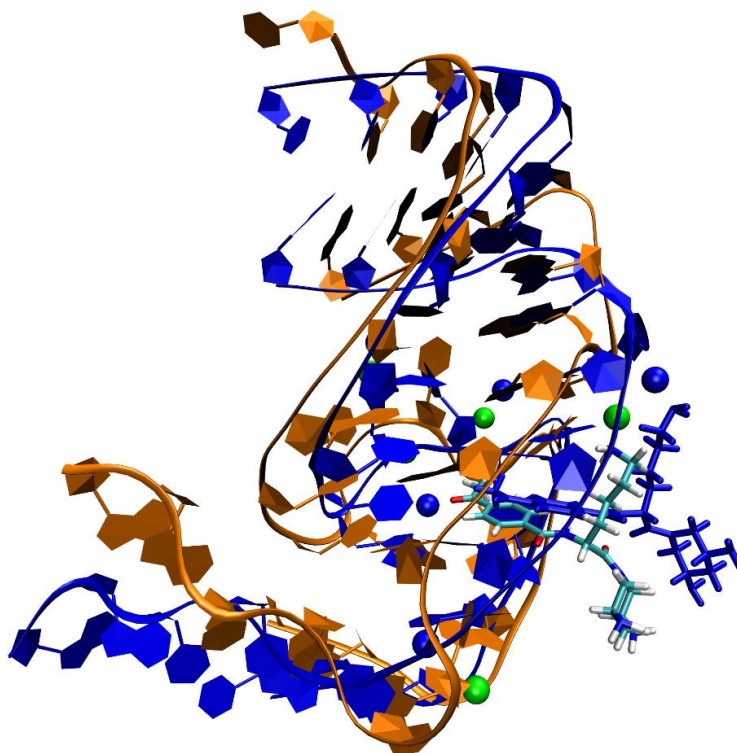
Slika 67. Diaminopiperidin (DAP derivat) (preuzeto iz [38]).

4.7.1. MD simulacije kompleksa IIa-DAP

Kako nije poznata 3D struktura kompleksa IIa RNA s vezanim ligandom DAP, korišten je savijeni oblik dane subdomene iz prethodnog istraživanja benzimidazolnih inhibitora, a ligand je izgrađen na način opisan u poglavlju 4.1. Parcijalni atomski naboji (ESP) za ligand DAP (dodatak, slika D7, tablica D6) određeni su kvantno mehaničkim računima pomoću programa GAUSSIAN09 [82,106,107] koristeći metodu funkcionala gustoće DFT (B3LYP) i baznog skupa 3-21G. Postupci otapanja, neutralizacije, optimizacije i MD simulacija provedeni su na isti način kao i kod kompleksa s benzimidazolnim inhibitorima. U eksperimentalnim istraživanjima pretpostavljeno je da se dani spoj veže kao interkalator. U svrhu ispitivanja stabilnosti takvog vezanja, sagrađene su početne strukture s ligandom DAP interkaliranim u vezno mjesto između susjednih baza A53 i G52 (vezno mjesto benzimidazolnih inhibitora) na dva načina. U oba slučaja interkalirana je podjedinica fenil metil keton, dok je ostatak molekule smješten uzduž malog utora. U prvom načinu vezanja („mod 1“) diaminopiperidin smješten je u smjeru „prema dolje“ tj. prema svijenom dijelu L-oblika RNA, a aminobutilna skupina u suprotnom smjeru. Kod drugog načina vezanja („mod 2“) cijeli ligand DAP zarotiran je za 180° što znači da sada diaminopiperidin „gleda prema gore“, a aminobutilna skupina prema svijenom dijelu dvostruke uzvojnice RNA IIa. Također, za dodatno ispitivanje stabilnosti interkalativnog načina vezanja, sagrađen je i kompleks u kojem je DAP vezan kao mali utor – vežući spoj („mod 3“).

Za sva tri slučaja provedeno je 70 ns MD simulacija. U strukturi svakog kompleksa nalaze se i Mg^{2+} ioni koji pospješuju stabilizaciju sustava. „Mod 3“ nije se pokazao kao stabilan već je došlo do odvajanja liganda iz veznog mjesta što upućuje na eksperimentalno pretpostavljeni interakalativni način vezanja danog inhibitora. „Mod 1“ pokazao se kao najstabilniji. Tijekom 70 ns MD simulacija DAP ostaje interkaliran u veznom mjestu i

stabilizira L-oblik RNA IIa (slika 68). U slučaju „moda 2“ došlo je do narušavanja L-oblika IIa. U prilog pretpostavci da je „mod 1“ najstabilniji način vezanja idu i izračunate slobodne energije vezanja (entalpijski doprinos) za dane komplekse („mod 1“ i „mod 2“), prikazane u tablici 13.



Slika 68. Početna (sve u plavoj boji, kuglice predstavljaju Mg^{2+} ione) i konačna struktura kompleksa IIa – DAP (RNA prikazana narančasto, ligand je obojan prema tipu atoma, a Mg^{2+} ioni dani su u zelenoj boji) („mod 1“).

Tablica 13. Entalpijski doprinos slobodnoj energiji vezanja izračunat MM_PBSA metodom za komplekse nakon 70 ns MD simulacija. (Objašnjenje pojedinog doprinosa dano je u odjeljku 3.1.5.)

| Energija (kcal/mol) | IIa – DAP („mod 1“) | IIa – DAP („mod 2“) |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| ELE | (-201,6±7,7) | (-496,2±30,0) |
| VDW | (-26,5±3,5) | (-9,3±0,5) |
| PBSUR | (-4,3±0,2) | (-4,3±0,1) |
| PBSOL | (68,2±6,7) | (358,5±27,0) |
| PBTOT | (-159,9±4,7) | (-126,2±1,2) |

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu proučeno je nekoliko sustava malih molekula i nukleinskih kiselina simuliranih u računalno stvorenim eksperimentalnim (biološkim) uvjetima. Dobiveni rezultati znatno su pridonijeli razumijevanju eksperimentalnih (prvenstveno spektroskopskih) mjerenja i omogućili uvid u detalje vezanja malih molekula za nukleinske kiseline.

Detaljno je proučen proces vezanja guanidiniokarbonil-pirol-arilnih konjugata i cijaninskih spojeva u mali utor dvostruke uzvojnice DNA poli dAdT-poli dAdT. Potvrđena je stabilnost vezanja cijaninskih spojeva u obliku monomera i dimera, kao i stabilizacija DNA od strane guanidiniokarbonil-pirol-arilnih konjugata. Na primjeru bisfenantridinskih spojeva i translacijskih inhibitora HCV-a istražen je utjecaj interkalativnog načina vezanja supstrata na stabilnosti dvostrukih RNA uzvojnica. Pokazano je da je dvostruka protonirana uzvojnica RNA poli rAH⁺-poli rAH⁺ puno stabilnija kada su na nju vezani bisfenantridini. U slučaju virusne (HCV) RNA, benzimidazolni inhibitori stabiliziraju Ila subdomenu u izduženom obliku, dok diaminopiperidinski konjugat (DAP) „zaključava“ RNA u L-obliku. Pored saznanja o obliku i stabilnosti navedenih kompleksa, značajan doprinos ovih istraživanja su novi parametri razvijeni za poli rAH⁺-poli rAH⁺, te razrađeni protokoli parametrizacije i modeliranja koji bi trebali olakšati daljnja istraživanja na sličnim sustavima.

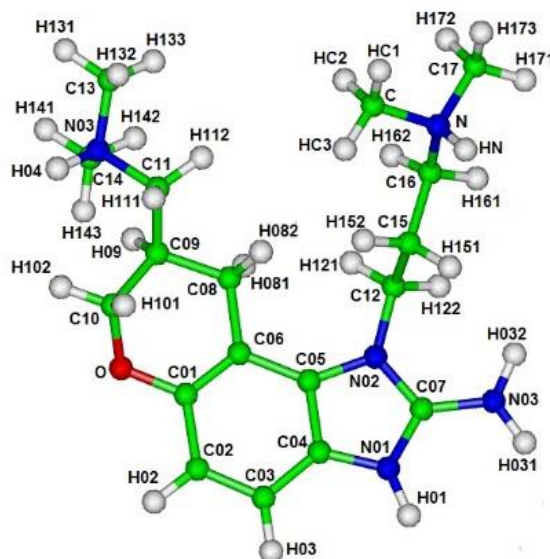
MD simulacije pokazale su da su konformacijske promjene IRES subdomene Ila reverzibilne, tj. da vezanjem benzimidazolnog inhibitora za savijeni oblik RNA dolazi do njezinog izduženja, odnosno, da se uklanjanjem inhibitora RNA vraća u L-oblik. Za razliku do inhibitora, vezanje analoga, za koji je eksperimentalno utvrđeno da nije povoljan inhibitor, ne rezultira konformacijskom promjenom izduženja RNA. Stabilnost vezanja benzimidazolnog inhibitora **2** kao interkalatora, na način utvrđen na temelju eksperimentalnih rezultata dobivenih difrakcijom X-zraka i NMR metodom, potvrđena je MD simulacijama i pokazano je da je dani kompleks dodatno stabiliziran s pet intermolekulskih vodikovih veza. Molekulskim modeliranjem istraženi su načini vezanja benzimidazolnog inhibitora **1** i diaminopiperidina DAP na Ila, za koje ne postoje eksperimentalno određene strukture. Dobiveni rezultati u skladu su s eksperimentalnim pretpostavkama.

Pored empirijskih, u radu su korištene i kvantno mehaničke metode u svrhu određivanja promjene u raspodjeli naboja na inhibitorima HCV-a do koje dolazi prilikom vezanja na IRES

Ila. Pokazano je da metoda EE daje bolji opis elektrostatskih interakcija između „QM“ i „MM“ slojeva jer omogućuje polarizaciju „QM“ dijela u ovisnosti o raspodjeli naboja u „MM“ sloju.

Istraživanja na navedenim skupinama spojeva, kao i proučavanje detalja njihovih interakcija (interkaliranje, vezanje u utor i elektrostatsko međudjelovanje, preraspodjela naboja) s polinukleotidima provedena su u svrhu dobivanja smjernica u dizajniranju novih, boljih inhibitora, molekulskih označivača te antitumorskih i antivirusnih lijekova sa svojstvom selektivnog blokiranja određenih sljedova DNA ili RNA.

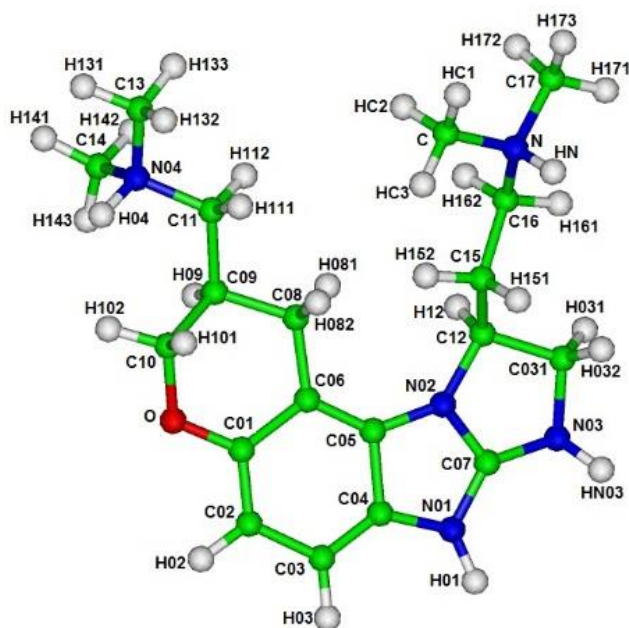
6. DODATAK



Slika D1. Inhibitor 2 s prikazanim imenima atoma.

Tablica D1. ESP naboji za inhibitor 2 određeni kvantno mehaničkom metodom DFT(B3LYP) s baznim skupom 3-21G.

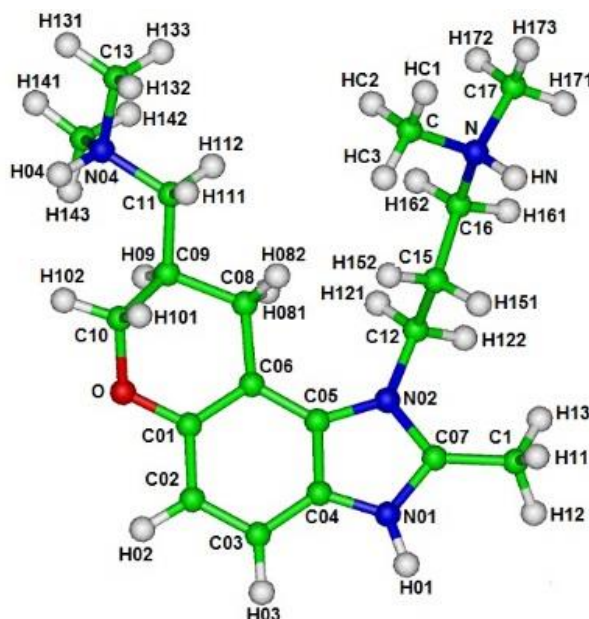
| inhibitor 2 | | | |
|-------------|----------------------|-----------|----------------------|
| Ime atoma | ESP naboji (e^+) | Ime atoma | ESP naboji (e^+) |
| C | -0,428670 | H01 | 0,374309 |
| N | 0,031493 | H02 | 0,241769 |
| O | -0,341155 | H03 | 0,235724 |
| C01 | 0,518278 | H031 | 0,361591 |
| N01 | -0,228367 | H032 | 0,364029 |
| C02 | -0,253610 | H04 | 0,345361 |
| N02 | -0,233560 | H081 | 0,091798 |
| C03 | -0,206680 | H082 | 0,094480 |
| N03 | -0,564492 | H09 | 0,123791 |
| C04 | 0,119817 | H101 | 0,117309 |
| N04 | 0,068203 | H102 | 0,108855 |
| C05 | 0,309104 | H111 | 0,249576 |
| C06 | -0,438762 | H112 | 0,278414 |
| C07 | 0,060740 | H121 | 0,019486 |
| C08 | 0,039720 | H122 | 0,105522 |
| C09 | 0,021353 | H131 | 0,221444 |
| C10 | 0,113217 | H132 | 0,212720 |
| C11 | -0,624230 | H133 | 0,228446 |
| C12 | 0,085582 | H141 | 0,219924 |
| C13 | -0,427889 | H142 | 0,227331 |
| C14 | -0,426583 | H143 | 0,206260 |
| C15 | 0,176466 | H151 | -0,012594 |
| C16 | -0,467311 | H152 | 0,040372 |
| C17 | -0,427816 | H161 | 0,201655 |
| HC1 | 0,222332 | H162 | 0,220120 |
| HC2 | 0,222883 | H171 | 0,214096 |
| HC3 | 0,195078 | H172 | 0,224181 |
| HN | 0,349997 | H173 | 0,218894 |



Slika D2. Inhibitor **1** s prikazanim imenima atoma.

Tablica D2. ESP naboji za inhibitor **1** određeni kvantno mehaničkom metodom DFT(B3LYP) s baznim skupom 3-21G.

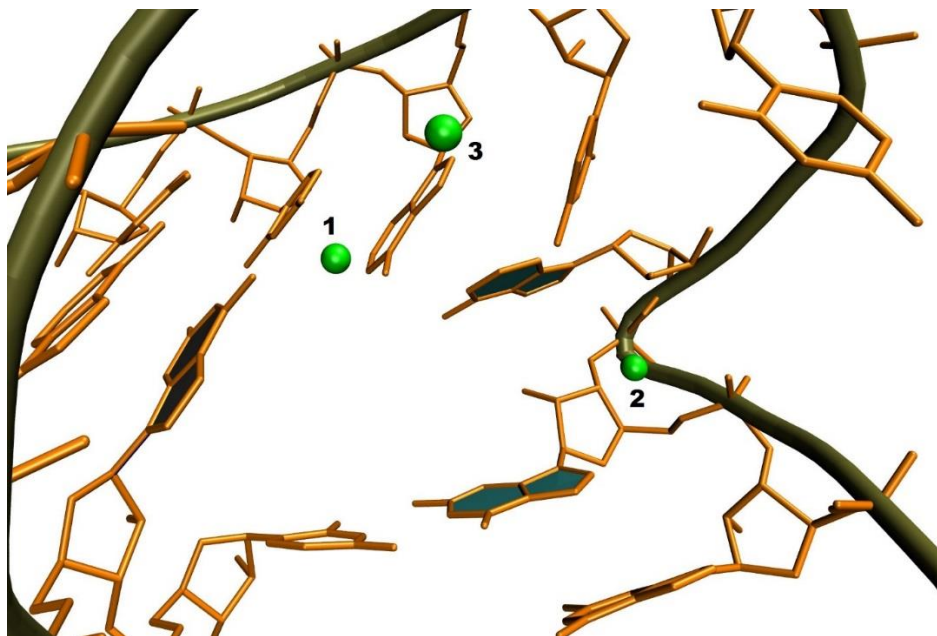
| inhibitor 1 | | | |
|-------------|------------------------------|-----------|------------------------------|
| Ime atoma | ESP naboji (e ⁺) | Ime atoma | ESP naboji (e ⁺) |
| C | -0,427011 | C09 | 0,021938 |
| HC1 | 0,226452 | H09 | 0,121920 |
| HC2 | 0,224920 | C10 | 0,109349 |
| HC3 | 0,195228 | H101 | 0,104058 |
| N | -0,020290 | H102 | 0,087795 |
| HN | 0,368749 | C11 | -0,496886 |
| O | -0,279250 | H111 | 0,224374 |
| C01 | 0,228348 | H112 | 0,256294 |
| N01 | -0,471901 | C12 | 0,001987 |
| H01 | 0,440577 | H12 | 0,132968 |
| C02 | -0,234736 | C13 | -0,432857 |
| H02 | 0,238402 | H131 | 0,225848 |
| N02 | -0,048319 | H132 | 0,209082 |
| C03 | -0,318752 | H133 | 0,229259 |
| H03 | 0,236235 | C14 | -0,467452 |
| N03 | -0,558111 | H141 | 0,230792 |
| C031 | -0,117195 | H142 | 0,238115 |
| H031 | 0,157698 | H143 | 0,217259 |
| H2 | 0,176039 | C15 | -0,010434 |
| HN03 | 0,441278 | H151 | 0,062024 |
| C04 | 0,315519 | H152 | 0,083469 |
| N04 | 0,022215 | C16 | -0,262592 |
| H04 | 0,362523 | H161 | 0,151774 |
| C05 | -0,210298 | H162 | 0,190716 |
| C06 | 0,064867 | C17 | -0,473925 |
| C07 | 0,516385 | H171 | 0,225884 |
| C08 | -0,220720 | H172 | 0,235726 |
| H081 | 0,123522 | H173 | 0,238799 |
| H082 | 0,112345 | | |



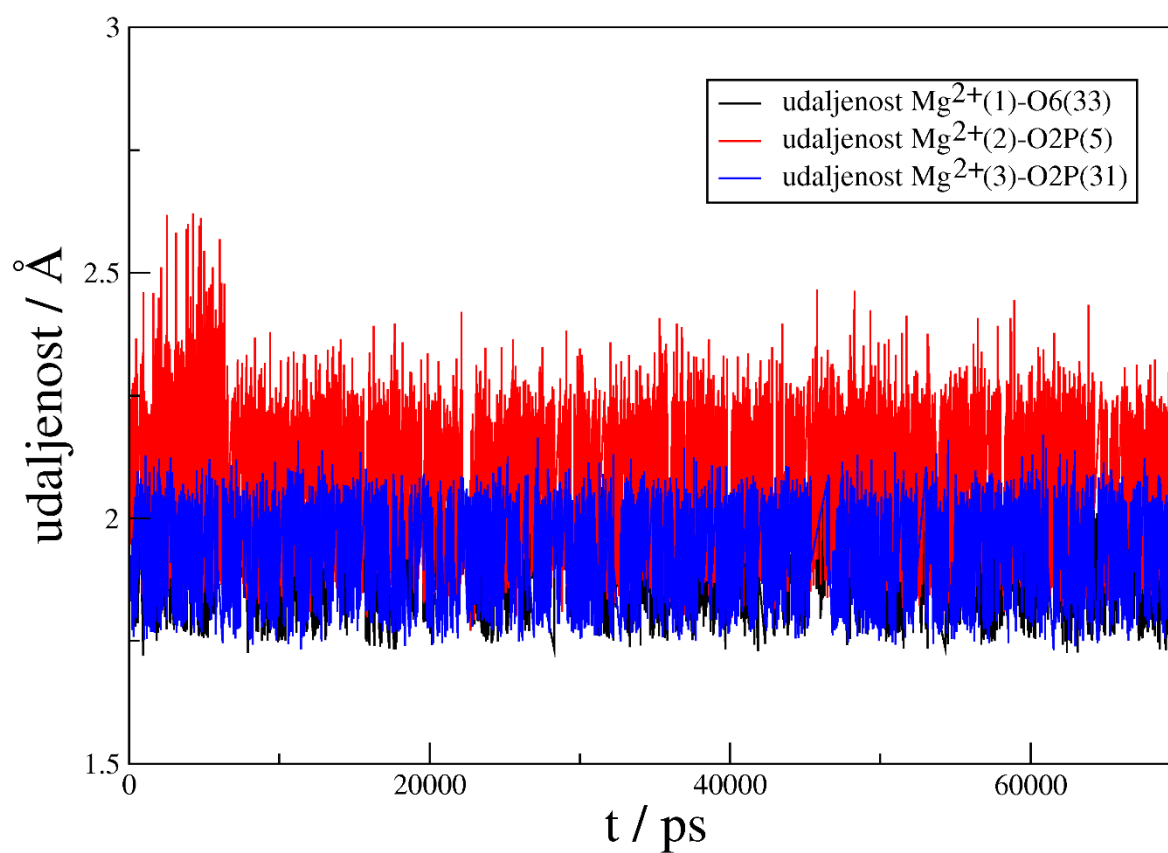
Slika D3. Analog **3** s prikazanim imenima atoma.

Tablica D3. ESP naboji za analog **3** određeni kvantno mehaničkom metodom DFT(B3LYP) s baznim skupom 3-21G.

| analog 3 | | | |
|-----------|----------------------|-----------|----------------------|
| Ime atoma | ESP naboji (e^+) | Ime atoma | ESP naboji (e^+) |
| C | -0,960523 | HC2 | 0,325971 |
| N | 0,703276 | HC3 | 0,309870 |
| O | -0,365199 | HN | 0,331896 |
| C01 | 0,665495 | H02 | 0,298642 |
| N01 | -0,436152 | H03 | 0,322833 |
| H01 | 0,494812 | H04 | 0,312299 |
| C02 | -0,585089 | H081 | 0,228033 |
| N02 | -0,020656 | H082 | 0,323894 |
| C03 | -0,722621 | H09 | 0,154406 |
| C1 | -1,061735 | H101 | 0,120593 |
| H11 | 0,329569 | H102 | 0,129121 |
| H12 | 0,315506 | H111 | 0,320118 |
| H13 | 0,330381 | H112 | 0,318701 |
| C04 | 0,344232 | H121 | 0,200040 |
| N04 | 0,743176 | H122 | 0,212764 |
| C05 | 0,315896 | H131 | 0,287408 |
| C06 | -0,478629 | H132 | 0,296688 |
| C07 | 0,765181 | H133 | 0,314318 |
| C08 | -0,503501 | H141 | 0,285884 |
| C09 | 0,045604 | H142 | 0,304023 |
| C10 | 0,074567 | H143 | 0,286201 |
| C11 | -0,872582 | H151 | 0,221868 |
| C12 | -0,290763 | H152 | 0,173117 |
| C13 | -0,903987 | H161 | 0,281440 |
| C14 | -0,874493 | H162 | 0,267580 |
| C15 | -0,384970 | H171 | 0,281909 |
| C16 | -0,581777 | H172 | 0,307266 |
| C17 | -0,907937 | H173 | 0,300211 |
| HC1 | 0,306126 | | |



Slika D4. Magnezijevi ioni u veznom mjestu NMR-om određene strukture IIa (simulirana bez vezanog liganda).



Slika D5. Analiza udaljenosti magnezijevih iona od susjednih atoma (svi atomi navedeni su u legendi grafa).

Tablica D4. ESP naboji dobiveni QM/MM računima za inhibitor **2** (slika D1).

| ESP naboji / jedinični naboj (e^+) | | | | | |
|--|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|--|
| atom | inh 2 modeliran s PCM | inh 2 iz kompleksa s IIa (ME) | inh 2 iz kompleksa s IIa (EE) | inh 2 iz kompleksa s IIa, s Mg^{2+} (ME) | inh 2 iz kompleksa s IIa, s Mg^{2+} (EE) |
| N03 | -0,943501 | -0,825192 | -1,081520 | -0,825720 | -1,088693 |
| H031 | 0,492014 | 0,413974 | 0,543157 | 0,413731 | 0,553079 |
| H032 | 0,495100 | 0,469946 | 0,521534 | 0,469993 | 0,518964 |
| C07 | 0,659518 | 0,477065 | 0,688863 | 0,479722 | 0,826527 |
| N01 | -0,486684 | -0,409576 | -0,495454 | -0,413106 | -0,568959 |
| H01 | 0,442867 | 0,427661 | 0,460142 | 0,428524 | 0,484690 |
| C04 | 0,150322 | 0,118241 | 0,169494 | 0,120637 | 0,118259 |
| C03 | -0,180582 | -0,123953 | -0,187042 | -0,124647 | -0,182002 |
| H03 | 0,200464 | 0,204816 | 0,232945 | 0,205204 | 0,217307 |
| C02 | -0,358560 | -0,231708 | -0,253760 | -0,232459 | -0,435475 |
| H02 | 0,200884 | 0,218542 | 0,240721 | 0,218511 | 0,241181 |
| C01 | 0,463289 | 0,418108 | 0,513515 | 0,423874 | 0,646930 |
| O | -0,534578 | -0,438181 | -0,610063 | -0,440900 | -0,568331 |
| C10 | 0,221707 | 0,260110 | 0,463490 | 0,267303 | 0,418322 |
| H101 | 0,055409 | -0,005797 | 0,032880 | -0,008108 | 0,008659 |
| H102 | 0,064173 | 0,103443 | 0,085657 | 0,102967 | 0,087638 |
| C09 | 0,152018 | -0,217871 | -0,344943 | -0,232851 | -0,400269 |
| C11 | -0,460923 | -0,138681 | -0,034937 | -0,135029 | -0,013620 |
| N04 | 0,235088 | -0,009985 | -0,143641 | -0,014591 | -0,152405 |
| C13 | -0,408194 | -0,358069 | -0,250257 | -0,356262 | -0,349987 |
| H131 | 0,205641 | 0,160915 | 0,127918 | 0,160415 | 0,161076 |
| H132 | 0,180990 | 0,211561 | 0,141671 | 0,211178 | 0,162931 |
| H133 | 0,185338 | 0,179612 | 0,272615 | 0,179519 | 0,198449 |
| C14 | -0,463059 | -0,318379 | -0,260765 | -0,313727 | -0,350247 |
| H141 | 0,199277 | 0,150130 | 0,161110 | 0,148909 | 0,184847 |
| H142 | 0,212545 | 0,192781 | 0,179404 | 0,191975 | 0,201057 |
| H143 | 0,192636 | 0,198681 | 0,146112 | 0,197497 | 0,170847 |
| H04 | 0,331763 | 0,338872 | 0,328009 | 0,339779 | 0,364840 |
| H111 | 0,181973 | 0,126227 | 0,043532 | 0,124679 | 0,152150 |
| H112 | 0,203265 | 0,159944 | 0,170680 | 0,160493 | 0,151073 |
| H09 | 0,054206 | 0,158623 | 0,154831 | 0,160101 | 0,211607 |
| C08 | 0,011108 | 0,139851 | 0,176082 | 0,168783 | 0,278163 |

*nastavak na sljedećoj stranici

*nastavak tablice D4

| ESP naboji / jedinični naboj (e^+) | | | | | |
|--|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|--|
| atom | inh 2 modeliran s PCM | inh 2 iz kompleksa s IIa (ME) | inh 2 iz kompleksa s IIa (EE) | inh 2 iz kompleksa s IIa, s Mg^{2+} (ME) | inh 2 iz kompleksa s IIa, s Mg^{2+} (EE) |
| H081 | 0,038259 | 0,049468 | 0,080671 | 0,044125 | 0,069589 |
| H082 | 0,080118 | 0,001298 | 0,038243 | -0,003178 | 0,035197 |
| C06 | -0,222840 | -0,183388 | -0,319342 | -0,199528 | -0,518463 |
| C05 | 0,054109 | -0,085509 | -0,002646 | -0,080919 | 0,278211 |
| N02 | -0,078135 | 0,129265 | -0,034917 | 0,121348 | -0,358774 |
| C12 | -0,196357 | -0,458698 | -0,164840 | -0,444845 | 0,217618 |
| H121 | 0,130609 | 0,165327 | 0,074050 | 0,161337 | 0,039686 |
| H122 | 0,159239 | 0,222175 | 0,122672 | 0,217438 | 0,059154 |
| C15 | 0,128196 | -0,007331 | -0,163920 | 0,003528 | -0,349491 |
| H151 | 0,039106 | 0,116194 | 0,178003 | 0,112139 | 0,223453 |
| H152 | 0,031853 | 0,089885 | 0,099482 | 0,087179 | 0,098358 |
| C16 | -0,300203 | -0,244765 | -0,187852 | -0,251014 | -0,158532 |
| H161 | 0,195339 | 0,199660 | 0,178341 | 0,200711 | 0,173468 |
| H162 | 0,160495 | 0,147067 | 0,115533 | 0,148130 | 0,112903 |
| N | 0,157320 | 0,068572 | 0,089532 | 0,066336 | 0,082587 |
| C17 | -0,389606 | -0,380101 | -0,406907 | -0,379986 | -0,358166 |
| H171 | 0,193606 | 0,229314 | 0,166143 | 0,229499 | 0,163914 |
| H172 | 0,185143 | 0,201700 | 0,203997 | 0,201926 | 0,213662 |
| H173 | 0,175084 | 0,168248 | 0,225557 | 0,167863 | 0,178318 |
| HN | 0,333719 | 0,322566 | 0,380193 | 0,323144 | 0,356359 |
| C | -0,379595 | -0,448720 | -0,433907 | -0,445471 | -0,448147 |
| HC1 | 0,189056 | 0,193645 | 0,195755 | 0,192825 | 0,245038 |
| HC2 | 0,181718 | 0,208481 | 0,232036 | 0,207546 | 0,233672 |
| HC3 | 0,178254 | 0,243936 | 0,142144 | 0,243469 | 0,161780 |

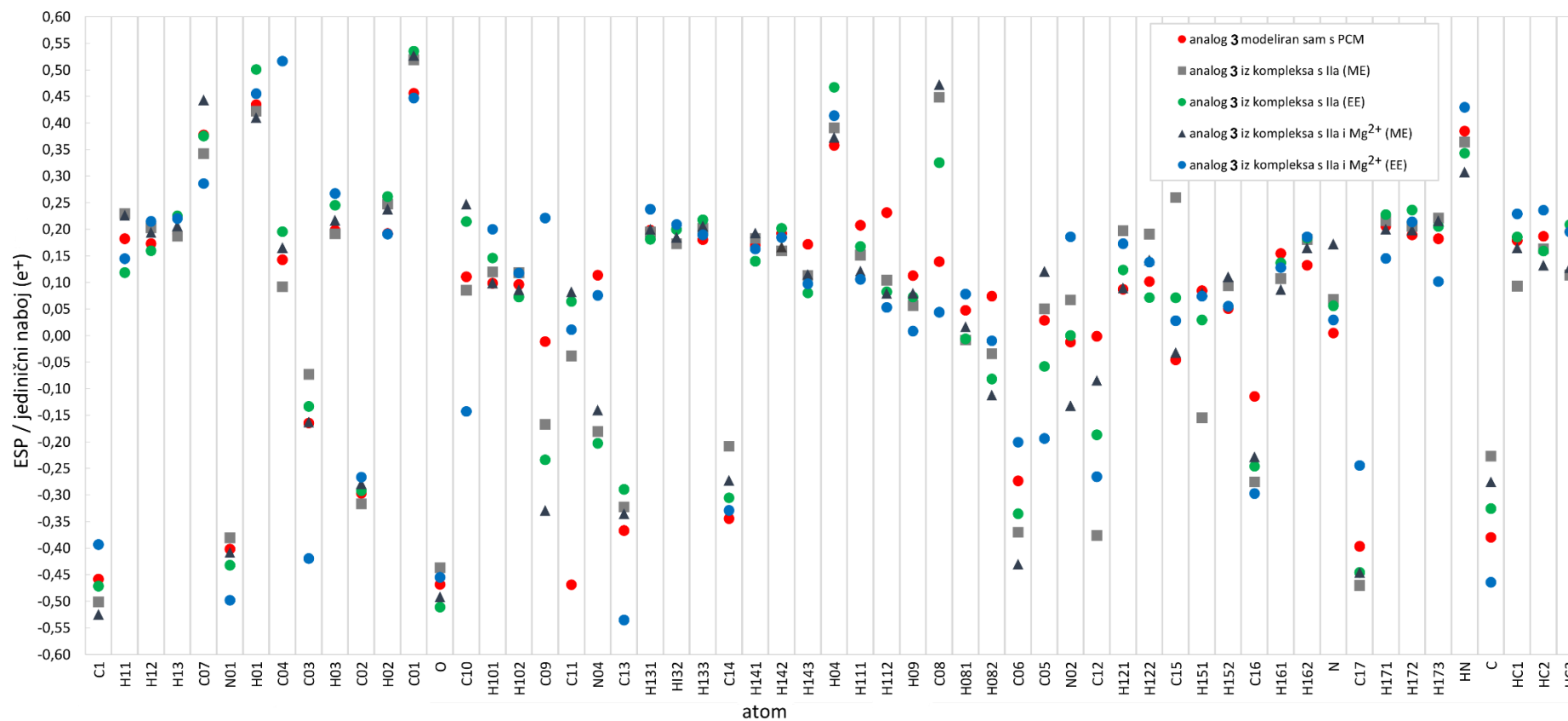
Tablica D5. ESP naboji dobiveni QM/MM računima za analog 3 (slika D3).

| ESP naboji / jedinični naboj (e^+) | | | | | |
|--|--------------------------------|--|--|---|---|
| atom | analog 3 modeliran s PCM | analog 3 iz kompleksa s IIa (ME) | analog 3 iz kompleksa s IIa (EE) | analog 3 iz kompleksa s IIa, s Mg^{2+} (ME) | analog 3 iz kompleksa s IIa, s Mg^{2+} (EE) |
| C1 | -0,457815 | -0,500980 | -0,471153 | -0,524401 | -0,392972 |
| H11 | 0,182575 | 0,229404 | 0,118888 | 0,226640 | 0,144930 |
| H12 | 0,173434 | 0,203119 | 0,159917 | 0,194385 | 0,215069 |
| H13 | 0,191525 | 0,186995 | 0,22538 | 0,206658 | 0,220549 |
| C07 | 0,377736 | 0,342444 | 0,375678 | 0,443578 | 0,286212 |
| N01 | -0,401349 | -0,380384 | -0,431907 | -0,407851 | -0,497906 |
| H01 | 0,434891 | 0,422383 | 0,501049 | 0,410420 | 0,455482 |
| C04 | 0,142917 | 0,092093 | 0,195765 | 0,165866 | 0,516795 |
| C03 | -0,164540 | -0,072774 | -0,133165 | -0,162369 | -0,419320 |
| H03 | 0,198557 | 0,191963 | 0,245695 | 0,217601 | 0,267726 |
| C02 | -0,296416 | -0,316165 | -0,291673 | -0,278470 | -0,266171 |
| H02 | 0,192111 | 0,248001 | 0,261773 | 0,238346 | 0,191299 |
| C01 | 0,456356 | 0,519257 | 0,535328 | 0,527154 | 0,447300 |
| O | -0,468146 | -0,436334 | -0,510795 | -0,491122 | -0,454457 |
| C10 | 0,110876 | 0,085530 | 0,214877 | 0,247816 | -0,142478 |
| H101 | 0,098930 | 0,120131 | 0,146197 | 0,099161 | 0,200195 |
| H102 | 0,096414 | 0,118605 | 0,072970 | 0,086358 | 0,117826 |
| C09 | -0,011181 | -0,166936 | -0,233701 | -0,328768 | 0,221496 |
| C11 | -0,468455 | -0,037982 | 0,064278 | 0,082373 | 0,011213 |
| N04 | 0,114067 | -0,180275 | -0,202503 | -0,140125 | 0,075921 |
| C13 | -0,366589 | -0,321980 | -0,289267 | -0,334916 | -0,534858 |
| H131 | 0,198904 | 0,195141 | 0,181463 | 0,200632 | 0,238033 |
| H132 | 0,173456 | 0,172950 | 0,199365 | 0,185461 | 0,209423 |
| H133 | 0,180711 | 0,201902 | 0,218007 | 0,206101 | 0,189794 |
| C14 | -0,344100 | -0,208248 | -0,305021 | -0,272202 | -0,328684 |
| H141 | 0,169938 | 0,183193 | 0,140122 | 0,193380 | 0,163247 |
| H142 | 0,192475 | 0,159822 | 0,202153 | 0,166777 | 0,185016 |
| H143 | 0,172003 | 0,113435 | 0,080274 | 0,115358 | 0,097516 |
| H04 | 0,358116 | 0,391456 | 0,467353 | 0,373190 | 0,414045 |
| H111 | 0,207944 | 0,151635 | 0,168015 | 0,121852 | 0,106096 |
| H112 | 0,231725 | 0,104511 | 0,082498 | 0,079878 | 0,053299 |
| H09 | 0,113028 | 0,056827 | 0,072865 | 0,079587 | 0,008410 |

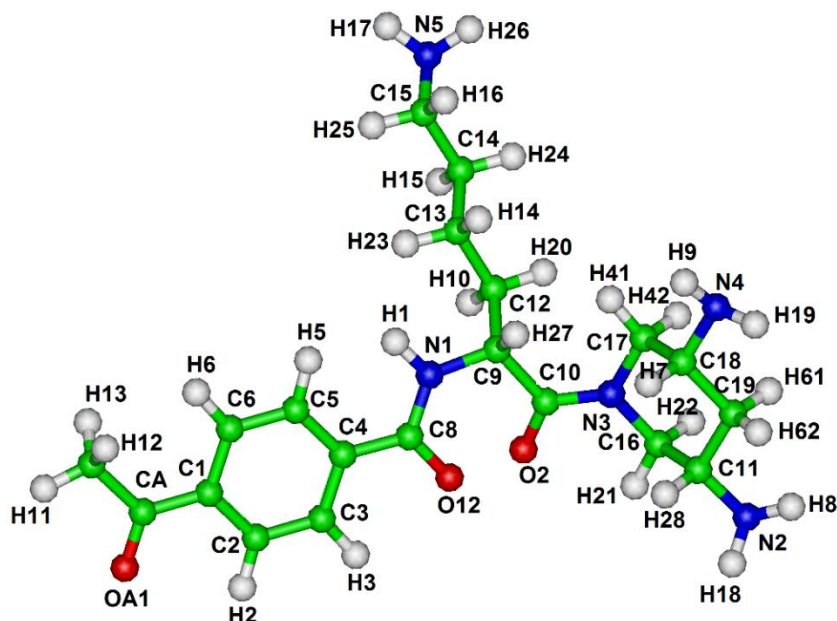
*nastavak na sljedećoj stranici

*nastavak tablice D5

| ESP naboji / jedinični naboj (e^+) | | | | | |
|--|--------------------------------|--|--|---|---|
| atom | analog 3 modeliran s PCM | analog 3 iz kompleksa s IIa (ME) | analog 3 iz kompleksa s IIa (EE) | analog 3 iz kompleksa s IIa, s Mg^{2+} (ME) | analog 3 iz kompleksa s IIa, s Mg^{2+} (EE) |
| C08 | 0,139285 | 0,448699 | 0,325529 | 0,472278 | 0,044234 |
| H081 | 0,047789 | -0,008180 | -0,005848 | 0,016664 | 0,078330 |
| H082 | 0,074311 | -0,033989 | -0,081490 | -0,111622 | -0,009694 |
| C06 | -0,273140 | -0,369801 | -0,334882 | -0,430011 | -0,200509 |
| C05 | 0,028856 | 0,050529 | -0,057823 | 0,121291 | -0,193391 |
| N02 | -0,012050 | 0,067349 | 0,000304 | -0,131633 | 0,186069 |
| C12 | -0,001194 | -0,375922 | -0,186510 | -0,084076 | -0,265321 |
| H121 | 0,087208 | 0,197493 | 0,124024 | 0,090133 | 0,172979 |
| H122 | 0,101750 | 0,191205 | 0,071633 | 0,142214 | 0,138319 |
| C15 | -0,045471 | 0,260123 | 0,071241 | -0,031695 | 0,028197 |
| H151 | 0,084577 | -0,154506 | 0,029645 | 0,080386 | 0,074454 |
| H152 | 0,050890 | 0,093591 | 0,055402 | 0,110544 | 0,055310 |
| C16 | -0,114327 | -0,275017 | -0,245800 | -0,227865 | -0,296873 |
| H161 | 0,154669 | 0,107469 | 0,137219 | 0,086704 | 0,128243 |
| H162 | 0,132780 | 0,180924 | 0,183839 | 0,165550 | 0,185953 |
| N | 0,004948 | 0,068629 | 0,056244 | 0,172517 | 0,029760 |
| C17 | -0,396183 | -0,469828 | -0,445485 | -0,445491 | -0,244077 |
| H171 | 0,206125 | 0,216369 | 0,228074 | 0,200536 | 0,145313 |
| H172 | 0,189312 | 0,205565 | 0,236412 | 0,199054 | 0,214211 |
| H173 | 0,182393 | 0,221426 | 0,205784 | 0,216498 | 0,101843 |
| HN | 0,385021 | 0,364619 | 0,343404 | 0,308200 | 0,429779 |
| C | -0,379501 | -0,226769 | -0,325506 | -0,274906 | -0,463863 |
| HC1 | 0,179229 | 0,093452 | 0,185743 | 0,165503 | 0,229227 |
| HC2 | 0,186913 | 0,163668 | 0,159216 | 0,132552 | 0,236161 |
| HC3 | 0,195712 | 0,114163 | 0,208906 | 0,128327 | 0,195305 |



Slika D6. Prikaz raspodjele ESP naboja za sve atome analoga **3**. Naboji su određeni QM i QM/MM računima za razne uvjete (bez i s Mg^{2+} ionima) te ME i EE pristupima.



Slika D7. Ligand DAP (diaminopiperidin) s prikazanim imenima atoma.

Tablica D6. ESP naboji za DAP određeni kvantno mehaničkom metodom DFT(B3LYP) s baznim skupom 3-21G.

| DAP | | | |
|-----------|----------------------|-----------|----------------------|
| Ime atoma | ESP naboji (e^+) | Ime atoma | ESP naboji (e^+) |
| C1 | -0,178882 | H28 | 0,043948 |
| C2 | -0,066608 | H21 | 0,106888 |
| C3 | -0,155540 | H22 | 0,079496 |
| C4 | -0,019070 | H41 | 0,200073 |
| C5 | -0,217382 | H42 | 0,168962 |
| C6 | -0,112648 | H7 | 0,001202 |
| CA | 0,647736 | H61 | 0,157583 |
| OA1 | -0,465998 | H62 | 0,138330 |
| H2 | 0,144206 | N2 | -1,110280 |
| H3 | 0,158699 | H8 | 0,404418 |
| H5 | 0,172778 | H18 | 0,420801 |
| H6 | 0,146228 | N4 | -1,061413 |
| C7 | -0,503859 | H9 | 0,396065 |
| H11 | 0,146490 | H19 | 0,410787 |
| H12 | 0,127721 | C12 | 0,025151 |
| H13 | 0,129171 | H10 | 0,042012 |
| C8 | 0,606109 | H20 | -0,006407 |
| O12 | -0,531289 | C13 | -0,228733 |
| N1 | -0,564568 | H14 | 0,060388 |
| H1 | 0,275242 | H23 | 0,071924 |
| C9 | 0,210007 | C14 | -0,147717 |
| H27 | 0,054182 | H15 | 0,063190 |
| C10 | 0,420805 | H24 | 0,065278 |
| O2 | -0,489073 | C15 | 0,411743 |
| C11 | 0,426666 | H16 | 0,008515 |
| C16 | -0,033885 | H25 | -0,043207 |
| N3 | -0,263638 | N5 | -1,114322 |
| C17 | -0,369303 | H17 | 0,398388 |
| C18 | 0,425859 | H26 | 0,408075 |
| C19 | -0,491291 | | |

7. LITERATURA

- [1] L. Pray, *Nature Education* **1** 1-8 (2008).
- [2] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee and L.G. Pedersen, *J Chem Phys* **103** 8577-8593 (1995).
- [3] C. Sagui and T.A. Darden, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28** 155-179 (1999).
- [4] D.A. Pearlman, D.A. Case, J.W. Caldwell, W.S. Ross, T.E. Cheatham, S. Debolt, D. Ferguson, G. Seibel and P. Kollman, *Comput. Phys. Commun.* **91** 1-41 (1995).
- [5] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M.C. Lee, G.M. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee *et al.*, *J Comput Chem* **24** 1999-2012 (2003).
- [6] <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/nucacids.htm>.
- [7] G. Capranico and F. Zunino, *Eur J Cancer* **28A** 2055-2060 (1992).
- [8] B.C. Baguley, *Anti-Cancer Drug Des* **6** 1-35 (1991).
- [9] T.R. Krugh, *Curr Opin Struc Biol* **4** 351-364 (1994).
- [10] S. Neidle and M.J. Waring. (1993) *Molecular aspects of anticancer drug-DNA interactions*. CRC, Boca Raton.
- [11] M.L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura and R.E. Dickerson, *P Natl Acad Sci USA* **82** 1376-1380 (1985).
- [12] L.M. Tumir, I. Piantanida, I.J. Cindric, T. Hrenar, Z. Meic and M. Zinic, *J. Phys. Org. Chem.* **16** 891-899 (2003).
- [13] L.M. Tumir, I. Piantanida, M. Zinic, I.J. Cindric, Z. Meic, M. Kralj and S. Tomic, *Eur. J. Med. Chem.* **41** 1153-1166 (2006).
- [14] L. Hernandez-Folgado, C. Schmuck, S. Tomic and I. Piantanida, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** 2977-2981 (2008).
- [15] A. Rodger. (1997) *Circular dichroism and linear dichroism*. Wiley Online Library.
- [16] <http://www.thebody.com/content/art53550.html>.
- [17] http://en.citizendium.org/wiki/Hepatitis_C_virus.
- [18] A. Rajendra and J.B. Wong, *J. Hepatol.* **47** 608-617 (2007).
- [19] M.J. Alter, *World J. Gastroenterol.* **13** 2436-2441 (2007).
- [20] J.F. Perz, G.L. Armstrong, L.A. Farrington, Y.J.F. Hutin and B.P. Bell, *J. Hepatol.* **45** 529-538 (2006).

-
- [21] K. Tsukiyama-Kohara, N. Iizuka, M. Kohara and A. Nomoto, *J. Virol.* **66** 1476-1483 (1992).
- [22] C.Y. Wang, P. Sarnow and A. Siddiqui, *J. Virol.* **67** 3338-3344 (1993).
- [23] J. Gallego and G. Varani, *Biochem. Soc. Trans.* **30** 140-145 (2002).
- [24] R. Jubin, *Curr. Opin. Investig. Drugs* **4** 162-167 (2003).
- [25] D.R. Davis and P.P. Seth, *Antivir. Chem. Chemother.* **21** 117-128 (2011).
- [26] B. Hoffman and Q. Liu, *Liver Int.* **31** 1449-1467 (2011).
- [27] J.S. Kieft, K. Zhou, R. Jubin, M.G. Murray, J.Y. Lau and J.A. Doudna, *J Mol Biol* **292** 513-529 (1999).
- [28] P.J. Lukavsky, I. Kim, G.A. Otto and J.D. Puglisi, *Nat. Struct. Biol.* **10** 1033-1038 (2003).
- [29] S.M. Dibrov, K. Ding, N.D. Brunn, M.A. Parker, B.M. Bergdahl, D.L. Wyles and T. Hermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109** 5223-5228 (2012).
- [30] S.M. Dibrov, J. Parsons, M. Carnevali, S. Zhou, K.D. Ryneerson, K. Ding, E. Garcia Sega, N.D. Brunn, M.A. Boerneke, M.P. Castaldi *et al.*, *J. Med. Chem.* (2013).
- [31] J. Parsons, M.P. Castaldi, S. Dutta, S.M. Dibrov, D.L. Wyles and T. Hermann, *Nat. Chem. Biol.* **5** 823-825 (2009).
- [32] G.A. Otto and J.D. Puglisi, *Cell* **119** 369-380 (2004).
- [33] C.M. Spahn, J.S. Kieft, R.A. Grassucci, P.A. Penczek, K. Zhou, J.A. Doudna and J. Frank, *Science* **291** 1959-1962 (2001).
- [34] D. Boehringer, R. Thermann, A. Ostareck-Lederer, J.D. Lewis and H. Stark, *Structure* **13** 1695-1706 (2005).
- [35] M.E. Filbin and J.S. Kieft, *RNA* **17** 1258-1273 (2011).
- [36] S.M. Dibrov, K. Ding, N.D. Brunn, M.A. Parker, B.M. Bergdahl, D.L. Wyles and T. Hermann, *P Natl Acad Sci USA* **109** 5223-5228 (2012).
- [37] R.B. Paulsen, P.P. Seth, E.E. Swayze, R.H. Griffey, J.J. Skalicky, T.E. Cheatham, 3rd and D.R. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** 7263-7268 (2010).
- [38] S.M. Dibrov, J. Parsons, M. Carnevali, S. Zhou, K.D. Ryneerson, K. Ding, E. Garcia Sega, N.D. Brunn, M.A. Boerneke, M.P. Castaldi *et al.*, *J. Med. Chem.* **57** 1694-1707 (2014).
- [39] M. Carnevali, J. Parsons, D.L. Wyles and T. Hermann, *ChemBioChem* **11** 1364-1367 (2010).

- [40] D.M. Ferguson, I.R. Gould, W.A. Glauser, S. Schroeder and P.A. Kollman, *J Comput Chem* **13** 525-532 (1992).
- [41] N. Raos. (1988) *Konformacijska analiza*. Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska.
- [42] A.R. Leach. (2001) *Molecular Modeling Principles and Practice*. Second edition ed. Prentice-Hall, Harlow, England
- [43] W.F. van Gunsteren, D. Bakowies, R. Baron, I. Chandrasekhar, M. Christen, X. Daura, P. Gee, D.P. Geerke, A. Glattli, P.H. Hunenberger *et al.*, *Angewandte Chemie* **45** 4064-4092 (2006).
- [44] <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/mechdynam2.html>.
- [45] M.D. Morse and S.A. Rice, *J Chem Phys* **76** 650-660 (1982).
- [46] J.E. Lennard-Jones, *Proceedings of the Physical Society* **43** 461-482 (1931).
- [47] A. Warshel and S. Lifson, *Israel J Chem* **7** P59-& (1969).
- [48] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell and P.A. Kollman, *J Am Chem Soc* **117** 5179-5197 (1995).
- [49] D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R.C. Walker, W. Zhang *et al.* (2008). University of California, San Francisco.
- [50] D.A. Case, Darden, T. A., Cheatham III, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Walker, R.C., Zhang, W., Merz, K. M., Roberts, B., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Kolossváry, I., Wong, K. F., Paesani, F., Vanicek, J., Liu, J., Wu, X., Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M.-J., Cui, G., Roe, D. R., Mathews, D. H., Seetin, M- G., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusarov, S., Kovalenko, A., Kollman, P. A. . (2010). University of California, San Francisco.
- [51] D.A. Case, T.A. Darden, I. T.E. Cheatham, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz *et al.* (2012). University of California, San Francisco.
- [52] C. Froese Fischer. (1977) *The Hartree-Fock method for atoms: a numerical approach*. Wiley.
- [53] D.R. Glowacki, J.N. Harvey and A.J. Mulholland, *Nat. Chem.* **4** 169-176 (2012).
- [54] R. Pytlak. (2009) *Conjugate Gradient Algorithms in Nonconvex Optimization*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- [55] J.P. Eckmann and D. Ruelle, *Rev Mod Phys* **57** 617-656 (1985).
- [56] L. Verlet, *Phys Rev* **159** 98-& (1967).
- [57] W.C. Swope, H.C. Andersen, P.H. Berens and K.R. Wilson, *J Chem Phys* **76** 637-649 (1982).
- [58] M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy and J.J.P. Stewart, *J Am Chem Soc* **107** 3902-3909 (1985).
- [59] D.S. Lemons and A. Gythiel, *Am J Phys* **65** 1079-1081 (1997).
- [60] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. Vangunsteren, A. Dinola and J.R. Haak, *J Chem Phys* **81** 3684-3690 (1984).
- [61] <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
- [62] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey and M.L. Klein, *J Chem Phys* **79** 926-935 (1983).
- [63] <http://www1.lsbu.ac.uk/water/models.html>.
- [64] T. Darden, D. Pearlman and L.G. Pedersen, *J Chem Phys* **109** 10921-10935 (1998).
- [65] P.P. Ewald, *Annalen der Physik* **369** 253-287 (1921).
- [66] T. Darden, L. Perera, L.P. Li and L. Pedersen, *Structure Fold. Des.* **7** R55-R60 (1999).
- [67] <http://isaacs.sourceforge.net/phys/pbc.html>.
- [68] M.R. Lee, Y. Duan and P.A. Kollman, *Proteins-Structure Function and Genetics* **39** 309-316 (2000).
- [69] B.R. Miller, T.D. McGee, J.M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke and A.E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.* **8** 3314-3321 (2012).
- [70] N. Homeyer and H. Gohlke, *Mol Inform* **31** 114-122 (2012).
- [71] B. Honig and A. Nicholls, *Science* **268** 1144-1149 (1995).
- [72] D. Sitkoff, K.A. Sharp and B. Honig, *J Phys Chem-Us* **98** 1978-1988 (1994).
- [73] M. Born, Oppenheimer, R., *Annalen der Physik* **84** 457-484 (1927).
- [74] R.G. Parr and W. Yang, *Annual review of physical chemistry* **46** 701-728 (1995).
- [75] P. Hohenberg and W. Kohn, *Phys Rev B* **136** B864-+ (1964).
- [76] J.C. Slater, *Physical Review* **36** 57-64 (1930).
- [77] P.M.W. Gill, *Adv Quantum Chem* **25** 141-205 (1994).
- [78] Ditchfie.R, D.P. Miller and J.A. Pople, *J Chem Phys* **54** 4186-& (1971).
- [79] S. Miertus, E. Scrocco and J. Tomasi, *Chem Phys* **55** 117-129 (1981).
- [80] E. Schrödinger, *Phys Rev* **28** 1049-1070 (1926).
- [81] J.J.P. Stewart, *J. Mol. Model.* **13** 1173-1213 (2007).

- [82] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson *et al.* (2009). Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- [83] J.J.P. Stewart. (2012), <http://OpenMOPAC.net>.
- [84] M.J.S. Dewar and W. Thiel, *J Am Chem Soc* **99** 4899-4907 (1977).
- [85] J.J.P. Stewart, *J Comput Chem* **10** 209-220 (1989).
- [86] J.A. Pople and D.L. Beveridge. (1970) *Approximate Molecular Orbital Theory*. McGraw-Hill, New York.
- [87] A. Warshel and M. Levitt, *J Mol Biol* **103** 227-249 (1976).
- [88] M. Svensson, S. Humbel, R.D.J. Froese, T. Matsubara, S. Sieber and K. Morokuma, *J Phys Chem-Us* **100** 19357-19363 (1996).
- [89] J.M. Wang, P. Cieplak and P.A. Kollman, *J Comput Chem* **21** 1049-1074 (2000).
- [90] <http://anusf.anu.edu.au/~vvv900/qm-mm.html>.
- [91] <http://accelrys.com/services/training/life-science/insight-migration.html>.
- [92] W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten, *J. Mol. Graph. Model.* **14** 33-38 (1996).
- [93] D.R. Roe and T.E. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.* **9** 3084-3095 (2013).
- [94] D.A. Case, T. Darden, T.E. Cheatham III, C. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, K.M. Merz, D.A. Pearlman and M. Crowley, *University of California, San Francisco* (2006).
- [95] L.M. Tumir, M. Grabar, S. Tomic and I. Piantanida, *Tetrahedron* **66** 2501-2513 (2010).
- [96] K. Groger, D. Baretic, I. Piantanida, M. Marjanovic, M. Kralj, M. Grabar, S. Tomic and C. Schmuck, *Organic & biomolecular chemistry* **9** 198-209 (2011).
- [97] L.M. Tumir, I. Crnolatac, T. Deligeorgiev, A. Vasilev, S. Kaloyanova, M. Grabar Branilovic, S. Tomic and I. Piantanida, *Chemistry* **18** 3859-3864 (2012).
- [98] M. Radic Stojkovic, M. Skugor, S. Tomic, M. Grabar, V. Smrecki, L. Dudek, J. Grolik, J. Eilmes and I. Piantanida, *Organic & biomolecular chemistry* **11** 4077-4085 (2013).
- [99] M. Grabar Branilovic, S. Tomic, L.M. Tumir and I. Piantanida, *Molecular bioSystems* **9** 2051-2062 (2013).
- [100] R. Rohs, X.S. Jin, S.M. West, R. Joshi, B. Honig and R.S. Mann, *Annual Review of Biochemistry, Vol 79* **79** 233-269 (2010).
- [101] B. Norden, A. Rodger and T. Dafforn, *Linear Dichroism and Circular Dichroism: A Textbook on Polarized Light Spectroscopy* 1-+ (2010).
- [102] U.C. Singh and P.A. Kollman, *J Comput Chem* **5** 129-145 (1984).

-
- [103] D.K. Mulliken, *Obstet. Gynecol.* **6** 219-220 (1955).
- [104] P.P. Seth, A. Miyaji, E.A. Jefferson, K.A. Sannes-Lowery, S.A. Osgood, S.S. Propp, R. Ranken, C. Massire, R. Sampath, D.J. Ecker *et al.*, *J. Med. Chem.* **48** 7099-7102 (2005).
- [105] M.A. Parker, E. Satkiewicz, T. Hermann and B.M. Bergdahl, *Molecules* **16** 281-290 (2011).
- [106] A.D. Becke, *J Chem Phys* **98** 5648-5652 (1993).
- [107] K.D. Dobbs and W.J. Hehre, *J Comput Chem* **8** 880-893 (1987).
- [108] S.M. Dibrov, H. Johnston-Cox, Y.H. Weng and T. Hermann, *Angewandte Chemie* **46** 226-229 (2007).

8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Marina Grabar Branilović

Datum rođenja: 18.06.1984.

Mjesto rođenja: Čakovec, Hrvatska

OBRAZOVANJE

2008 – sada: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Poslijediplomski studij fizike, smjer Medicinska fizika

2002 – 2007: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Fizički odsjek, smjer Profesor fizike i informatike

1998 – 2002: Gimnazija Čakovec (Opći smjer)

RADNO ISKUSTVO

2007 – sada: Znanstveni novak – Institut Ruđer Bošković u Zagrebu,
Zavod za fizičku kemiju, Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju

2010 – 2012: Vanjski suradnik (Asistent) – Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički
fakultet, Fizički odsjek;
Kolegiji: Početni fizički praktikum 1 i 2, Fizički praktikum 1 i 2

09.-12. 2006: Zamjenski profesor iz Fizike i Tehničke kulture – Osnovna škola Markuševac,
Zagreb

NAGRADE

2003 – 2007: Državna stipendija za osobito nadarene redovite studente Republike Hrvatske

RAD NA PROJEKTU

Proučavanje biomakromolekula računalnim metodama i razvoj novih algoritama
(098-1191344-2860)

PODRUČJA ZNANOSTI

Biofizika i medicinska fizika, biokemija, molekularna biologija, interdisciplinarne prirodne
znanosti.

ČLANSTVA U PROFESIONALNIM UDRUGAMA / DRUŠTVIMA

2009. – sada: Hrvatsko biofizičko društvo

ZNANSTVENA PUBLIKACIJA

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. Grabar Branilović, Marina; Tomić, Sanja; Tumir, Lidija-Marija; Piantanida, Ivo. **The bis-phenanthridinium system flexibility and position of covalently bound uracil finely tunes the interaction with polynucleotides.** // Molecular biosystems. **9** (2013), 8; 2051-2062 (članak, znanstveni).
2. Radić Stojković, Marijana; Škugor, Marko; Tomić, Sanja; Grabar, Marina; Smrečki, Vilko; Dudek, Łukasz; Grolik, Jarosław; Eilmes, Julita; Piantanida, Ivo. **Dibenzotetraaza[14]annulene – adenine conjugate recognizes complementary poly dT among ss-DNA / ss-RNA sequences.** // Organic & biomolecular chemistry. **11** (2013); 4077-4085 (članak, znanstveni).
3. Tumir, Lidija-Marija; Crnolatac, Ivo; Deligeorgiev, Todor; Vasilev, Aleksey; Kaloyanova, Stefka; Grabar Branilović, Marina; Tomić, Sanja; Piantanida, Ivo. **Kinetic differentiation between homo- and alternating AT-DNA by sterically restricted phosphonium dyes.** // Chemistry : a European journal. **18** (2012), 13; 3859-3864 (članak, znanstveni).
4. Groger, Kathrin; Baretić, Domagoj; Piantanida, Ivo; Marjanović, Marko; Kralj, Marijeta; Grabar, Marina; Tomić, Sanja; Schmuck, Carsten. **Guanidiniocarbonyl-pyrrole-aryl conjugates as nucleic acid sensors: switch of binding mode and spectroscopic responses by introducing additional binding sites into the linker.** // Organic & biomolecular chemistry. **9** (2011), 1; 198-209 (članak, znanstveni).
5. Tumir, Lidija-Marija; Grabar, Marina; Tomić, Sanja; Piantanida, Ivo. **The interactions of bis-phenanthridinium – nucleobase conjugates with nucleotides: adenine conjugate recognizes UMP in aqueous medium.** // Tetrahedron. **66** (2010), 13; 2501-2513 (članak, znanstveni).

Ostali radovi u drugim časopisima:

1. Grabar Branilović, Marina; Maršavelski, Aleksandra; Tomić, Antonija; Tomić, Sanja. **Nobelova nagrada za kemiju za 2013. godinu.** // Kemija u industriji : časopis kemičara i tehnologa Hrvatske. **62** (2013), 11-12; 468-471 (osvrt, stručni).

Sažeci u zbornicima skupova (sudjelovanje na kongresima):

1. Tomić, Sanja; Grabar, Marina; Piantanida, Ivo. **Molecular modeling of nucleic acid - small molecule interactions** // Book of Abstracts Regional Biophysical Conference 2012 / Zakrzewska, Joanna, Živić, Miroslav, Andjus, Pavle (ur.). Beograd, Srbija : Društvo biofizičara Srbije, 2012. 13-13 (pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
2. Grabar, Marina; Tomić, Sanja; Tumir Marija, Lidija; Piantanida, Ivo. **Molecular modeling of new permanently charged phenanthridinium-nucleobase conjugates in complexes with double stranded polynucleotides** // Ninth Triennial Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists - Book of Abstracts / Yáñez, Manuel ; Mó, Otilia (ur.). Santiago de Compostela, 2011. PII 017 (poster, sažetak, znanstveni).
3. Grabar, Marina; Tomić, Sanja; Tumir, Lidija-Marija; Piantanida, Ivo; Crnolatac, Ivo. **Molecular modelling of phosphonium cyanine dyes in complex with DNA** // Book of Abstracts of the The 5th Central European Conference - Chemistry towards Biology. Zagreb : IRB, 2010. 85 (poster, sažetak, znanstveni).
4. Grabar, Marina; Tomić, Sanja; Tumir, Lidija-Marija; Piantanida, Ivo; Crnolatac, Ivo; Deligeorgiev, Todor; Vasilev, Alexey; Kaloyanova, Stefka. **Interaction of phosphonium cyanine dyes with DNA** // Abstracts of the Fourth Humboldt Conference on Computational Chemistry / Petrova, P. Galina ; Vayssilov, N. Georgie (ur.). Sofia, 2010. 62 (poster, sažetak, znanstveni).
5. Marina Grabar, Lidija-Marija Tumir, Ivo Piantanida, Sanja Tomić. **Bisphenanthridinium-nucleobase conjugates – molecular modelling and spectroscopic approach** // Book of Abstracts of the EMBO Young Scientists Forum. Zagreb (poster, sažetak).
6. Grabar, Marina; Tumir, Lidija-Marija; Piantanida, Ivo; Tomić, Sanja. **Computational approach to specificity of intercalators toward nucleotides** // Book of Abstracts of the Tenth international summer school on biophysics - supramolecular structure and function. Rovinj, 2009. 105 (poster, sažetak).
7. Marina Grabar, Lidija-Marija Tumir, Ivo Piantanida, Sanja Tomić. **Computational and spectroscopic studies of intercalators and their interaction with nucleotides** // Book of Abstracts of The third Adriatic Meeting on computational Solutions in the Life Sciences. Zagreb : IRB, 2009. 56 (poster, sažetak).
8. Marina Grabar, Lidija-Marija Tumir, Ivo Piantanida, Sanja Tomić. **Molecular modelling of bisphenanthridinium-nucleobase conjugates** // Book of Abstracts of the International Conference and Biophysics Summer School From Solid State to Biophysics IV / L. Forro, D. Pavuna (ur.). Switzerland : EPFL, 2008. (poster, sažetak).
9. Marina Grabar, Lidija-Marija Tumir, Ivo Piantanida, Sanja Tomić. **Molecular modelling of bisphenanthridinium-nucleobase conjugates** // Book of Abstracts of the MATH/CHEM/COMP - The Dubrovnik International Course on the Interfaces among Mathematics, Chemistry and Computer Sciences / A. Graovac, B. Pokrić, V. Smrečki (ur.). Zagreb : IRB, 2008. 20 (poster, sažetak).